N° d'enregistrement
au C.N.R.S.
A.O. 8538

THÈSE

DE DOCTORAT D'ÉTAT ES SCIENCES NATURELLES

PRÉSENTÉE

A L'UNIVERSITÉ PARIS VI

PAR

Claude LASNE

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ES SCIENCES

SUJET DE LA THÈSE

LE BENZO(a)PYRENE : SES EFFETS BIOLOGIQUES ET SA PÉNÉTRATION *IN VITRO* DANS LA CELLULE.

Soutenue le 20 juin 1973, devant la Commission d'Examen

MM.	A. THOMAS	**Président**
	A. HOLLANDE	**Examinateurs**
	R. MONIER	**Examinateurs**
	I. CHOUROULINKOV	**Membre invité, rapporteur**

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41542715_0018

N° d'enregistrement
au C.N.R.S.
A.O. 8538

THÈSE

DE DOCTORAT D'ÉTAT ES SCIENCES NATURELLES

PRÉSENTÉE

A L'UNIVERSITÉ PARIS VI

PAR

Claude LASNE

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ES SCIENCES

SUJET DE LA THÈSE

LE BENZO(a)PYRENE : SES EFFETS BIOLOGIQUES ET SA PÉNÉTRATION *IN VITRO* DANS LA CELLULE.

Soutenue le 20 juin 1973, devant la Commission d'Examen

MM.	A. THOMAS	**Président**
	A. HOLLANDE	**Examinateurs**
	R. MONIER	**Examinateurs**
	I. CHOUROULINKOV	**Membre invité, rapporteur**

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Monsieur A. THOMAS, Professeur à la Faculté des Sciences de Paris, m'a fait un très grand honneur en acceptant outre ses multiples tâches, la présidence de cette thèse.

Qu'il veuille bien trouver ici le témoignage de ma respectueuse considération.

Monsieur A. HOLLANDE, Professeur à la Faculté des Sciences de Paris, a bien voulu faire partie de ce jury. Je lui en suis infiniment reconnaissante.

Monsieur R. MONIER, Directeur de l'Institut de Recherches Scientifiques sur le Cancer et membre de ce jury, m'a permis de terminer cette thèse en me prodiguant ses encouragements et ses conseils éclairés.
Qu'il soit assuré de ma très respectueuse gratitude.

Monsieur I. CHOUROULINKOV, Maître de Recherches au CNRS, m'a confié cette étude, et l'a dirigée avec foi et compétence. Il m'a aidée en toutes circonstances et soutenue de son expérience tout au long de ces années. Ce travail est une nouvelle occasion de lui manifester ma confiance et ma très sincère reconnaissance pour avoir suscité en moi le goût de la recherche et assuré ma formation de biologiste.

Je tiens également à remercier Monsieur P. LAZAR, Maître de Recherches à l'INSERM, auquel je suis redevable de l'analyse statistique de certains des résultats.

Toute l'équipe du Service de Médecine Expérimentale s'est associée à ce travail par son aide effective et amicale, particulièrement Mesdames MARGOT, CHAUVEHEID et HORY. Madame RENAULT s'est chargée du secrétariat. Son dynamisme et sa constante bonne humeur ont facilité la réalisation pratique de cette thèse. Madame MAUGAIN l'a secondée efficacement.
Que tous trouvent ici, l'expression de ma profonde gratitude.

LE BENZO(a)PYRENE : SES EFFETS BIOLOGIQUES ET SA PENETRATION *IN VITRO* DANS LA CELLULE

INTRODUCTION

La première relation entre une substance chimique et le développement d'une tumeur fut établie en 1775, lorsque PERCIVAL POTT signala les tumeurs cutanées des ramoneurs, tumeurs professionnelles reliées directement à la suie qui entrait en contact avec la peau. Ce fait n'a été confirmé expérimentalement qu'en 1918 par YAMAGIWA et ITCHIKAWA (1918) qui ont obtenu des tumeurs cutanées chez des lapins badigeonnés avec du goudron de houille. KENNAWAY et son école (1924) de leur côté ont réussi à obtenir des tumeurs avec les goudrons synthétiques qu'ils produisirent, puis COOK, HEWETT et HIEGER (1933) isolèrent du goudron de houille le constituant le plus actif : le benzo(a)pyrène, qu'ils synthétisèrent la même année à partir du pyrène et de l'anhydride succinique.

Le benzo(a)pyrène n'est pas le seul constituant cancérogène du goudron de houille, mais par son action biologique il se classe parmi les substances les plus actives. De plus, il se trouve en quantité considérable dans l'atmosphère des villes (HUEPER, 1966), dans la fumée de cigarettes (WYNDER et HOFFMANN, 1967) et même dans les poissons fumés (KURATSUNE et coll., 1966), etc.... Il pourrait donc jouer un rôle impor-

tant quant à l'augmentation de l'incidence des tumeurs pulmonaires et digestives chez l'Homme.

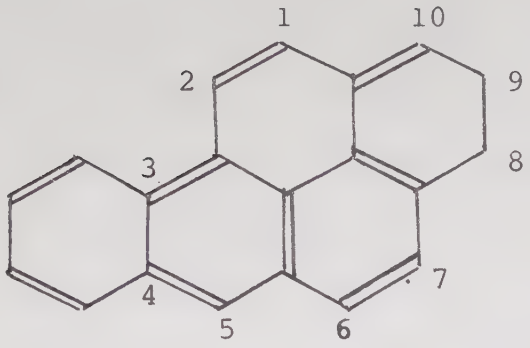
Aussi, le benzo(a)pyrène-B(a)P est-il un des hydrocarbures les plus utilisés dans l'étude de la pathogénie des tumeurs chimiquement induites, du mode d'action des hydrocarbures et du mécanisme de la transformation cellulaire.

Cependant l'ensemble des travaux ne paraît pas conduire à des conclusions définitives. En effet, l'hétérogénéité des expériences, l'imprécision des techniques, la diversité des modèles expérimentaux traduisent l'extrême complexité du problème. A la suite de ces constatations, nous nous sommes proposés plusieurs buts :

- Faire une revue des effets biologiques du B(a)P sur l'animal, en l'illustrant d'une expérience personnelle.
- Dégager et adopter un modèle expérimental en culture de tissus permettant l'étude de la transformation cellulaire.
- Enfin, élaborer une voie d'approche *in vitro* de l'étude du mode d'action du B(a)P -et par la suite des autres hydrocarbures polycycliques cancérogènes- au niveau cellulaire, et du mécanisme de la transformation cellulaire.

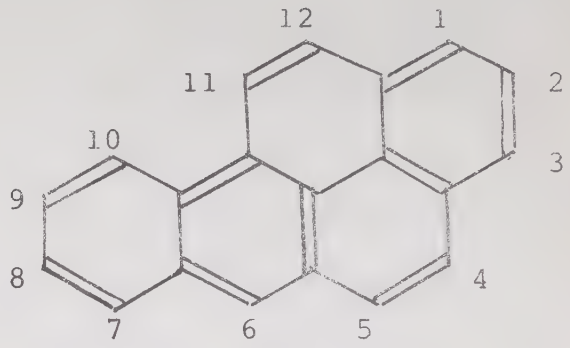
PROPRIETES CHIMIQUES DU 3,4-BENZOPYRENE OU BENZO(a)PYRENE-B(a)P

C'est un hydrocarbure aromatique polybenzénique, dérivé du pyrène sur lequel un noyau benzénique est accolé en position 3,4 ou (a) selon l'ancienne ou la nouvelle nomenclature.



3,4-benzopyrène

Ancienne nomenclature

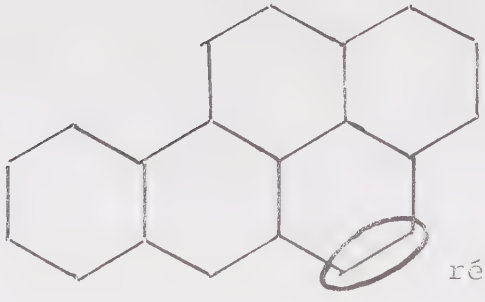


Benzo(a)pyrène

Nouvelle nomenclature

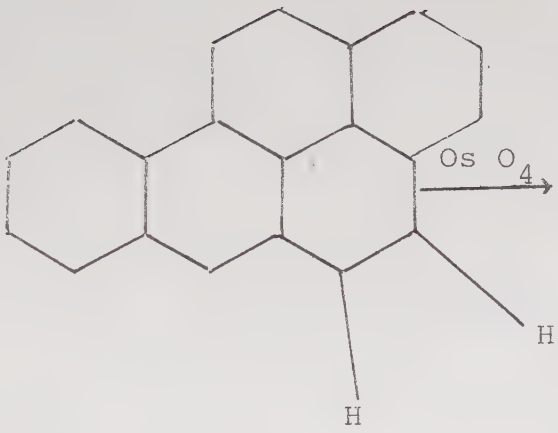
Il se présente sous forme de paillettes jaune pâle dont le point de fusion est 176° - 176°5 (CLAR, 1964). Il est soluble dans le benzène, le toluène, l'acétone, légèrement soluble dans l'alcool (Merck, Index). Dans l'acide sulfurique concentré il forme une solution rouge orangée avec une fluorescence verte (CLAR, 1964). Il possède 5 bandes caractéristiques de fluorescence aux longueurs d'ondes de 3950, 4036, 4087, 4267, 4540 Å (Thèse de HUBERT-HABART, 1959). En solution dans le benzène, il émet une fluorescence violette.

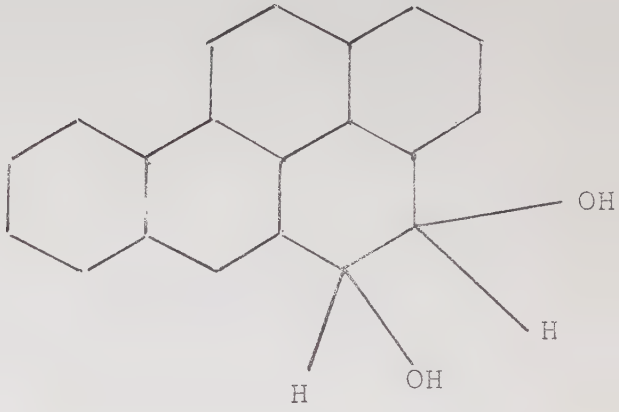
La forte activité cancérogène du B(a)P s'explique d'après PULLMAN, A. et PULLMAN, B. (1955) par l'existence d'une zone K très active et l'absence de région L. En effet, le pouvoir cancérogène d'une molécule est déterminé, toujours d'après PULLMAN et PULLMAN, par une région K très active et une région L au contraire suffisamment peu active pour ne pas engager la substance dans une action différente, avant que la région K ait eu le temps d'agir. En effet, la région K ou zone mésophénanthrénique de la molécule est caractérisée par *le plus grand indice de liaison mobile*. La région L, ou région mésoanthracénique contient *des carbones doués de la plus grande valence libre*.L'absence de cette région L dans le B(a)P est confirmée par le manque de réaction vis-à-vis de l'anhydride maléique.



région K

Quant à la réactivité de la région K, elle se mesure par sa vitesse d'oxydation par le tétraoxyde d'osmium. Elle a lieu sur la double liaison 6-7 du 3,4-benzopyrène et conduit à la formation d'un dihydrodiol.





PREMIER CHAPITRE

EFFETS BIOLOGIQUES DU BENZO(a)PYRENE-B(a)P

I - EFFETS BIOLOGIQUES DU BENZO(a)PYRENE-B(a)P SUR L'ANIMAL

1°/ *TOXICITE DU BENZO(a)PYRENE-B(a)P*

A notre connaissance, la toxicité du B(a)P in vivo n'a pas été étudiée de façon systématique et il n'y a pas de lésions spécifiques comme celles provoquées par le 7,12-diméthylbenz(a)anthracène au niveau de la glande surrénale (HUGGINS et coll., 1961).

Néanmoins, la cancérisation par le B(a)P peut être considérée comme un effet toxique chronique. L'hyperplasie épidermique et la métaplasie de l'épithélium bronchique, premières manifestations de la transformation pourraient bien être assimilées à des réactions toxiques provoquées par le B(a)P. Aussi, l'étude de la toxicité du B(a)P in vivo se ramène à l'étude de ses effets biologiques, se traduisant à long terme par le développement de tumeurs.

Par contre, la toxicité du B(a)P in vitro a fait l'objet de nombreuses études. Dans un souci de clarté, nous y reviendrons en temps utile.

2°/ EFFETS DU BENZO(a)PYRENE-B(a)P SUR LE TISSU SOUS-CUTANE OU TISSU CONJONCTIF

L'injection du B(a)P par voie sous-cutanée entraîne la formation de sarcomes, tumeurs malignes du tissu conjonctif (MAISIN et coll., 1934 ; SANNIE et coll., 1935 ; OBERLING et coll., 1936, 1939b ; BRYAN et SHIMKIN, 1943 ; ROUSSY et coll., 1944 ; PEACOCK et coll., 1949 ; STEINER, 1955 ; HIEGER, 1959, 1961 ; GRANT et coll., 1968 ; HOMBURGER, 1972) et des adénomes pulmonaires (TRUHAUT, et coll., 1972).

Le B(a)P est injecté en solution dans l'huile d'olive, la graisse animale fondue, le saindoux, la tricaprylline ou le cholestérol.

L'*"incidence tumorale"* ou nombre de tumeurs obtenues est proportionnelle à la concentration du B(a)P. Par contre, *"le temps de latence"* ou temps moyen d'apparition des tumeurs est inversement proportionnel à sa concentration (BRYAN et SHIMKIN, 1943 ; HIEGER, 1961).

3°/ EFFETS DU BENZO(a)PYRENE-B(a)P SUR LE TUBE DIGESTIF

L'ingestion du B(a)P provoque le développement de tumeurs gastriques, au niveau du préestomac (papillomes, épithéliomas, carcinomes) (RUSCH et coll., 1940 ; COLLINS et coll., 1943 ; SETALA et coll., 1950 ; ERMELA et coll., 1951 ; EKWALL et coll., 1952 ; BERENBLUM et HARAN, 1955, 1957 ; NORDEN, 1957a ; PEIRCE, 1961 ; RIGDON et coll., 1966, 1969 ; CHOUROULINKOV et coll., 1967), d'adénomes pulmonaires et d'adénocarcinomes et des leucémies (RIGDON et coll., 1967).

L'administration du B(a)P est généralement effectuée, soit par tubage gastrique, soit par son addition à l'eau de boisson ou au régime.

Certains ont implanté directement des pellets dans la muqueuse gastrique, où par la suite se sont développés des sarcomes et des carcinomes (GRANT et coll., 1955).

4°/ EFFETS DU BENZO(a)PYRENE-B(a)P SUR LE POUMON ET LES VOIES RESPIRATOIRES

Les premiers essais d'implantation de pellets dans les poumons n'ont pas donné de résultats nets (KUSCHNER et coll., 1956 ; BLACKLOCK, 1957). SHABAD (1962) n'obtient pas non plus de tumeurs en injectant le B(a)P directement dans le poumon, alors que des sarcomes se développent dans l'oesophage et autour de la trachée. L'injection intratrachéale entraîne l'apparition de tumeurs pulmonaires (PYLEV, 1962). Dans ce cas, le B(a)P est soit injecté en suspension dans une solution de Tween 60 (HERROLD et DUNHAM, 1962 ; MILLER et coll., 1965 ; SMITH et coll., 1970, 1971), soit dispersé dans de la poudre d'encre de chine (PYLEV, 1962, 1964 ; PYLEV et coll., 1969 ; SHABAD et PYLEV, 1970), soit encore mélangé après dissolution dans une solution saline à de très fines particules inertes comme l'hématite (SAFFIOTTI et coll., 1963, 1968, 1972 ; BLAIR et coll., 1972) ou le furfural (FERON, 1972). Cette technique provoque une réaction inflammatoire chronique et se rapproche de la façon

dont l'Homme est exposé à l'inhalation des substances cancérogènes. L'injection intratrachéale du B(a)P entraîne tout d'abord une hyperplasie de l'épithélium respiratoire, une métaplasie squameuse (HARRIS et coll., 1972), puis l'apparition de papillomes, de carcinomes des bronches, de la trachée et du larynx. Ces études sont surtout réalisées sur des rats (LASKIN et coll., 1970 ; SHABAD et PYLEV, 1970), sur des hamsters (SAFFIOTTI et coll., 1968, 1972 ; DONTENWILL et coll., 1968 ; CROCKER et coll., 1970 ; LITTLE et coll., 1970). Le Canard (RIGDON et NEAL, 1965 ; RIGDON, 1970), la Souris (HO et coll., 1972) et le Singe (CROCKER, et coll., 1970) ont été également utilisés. Il semble que les rats et les hamsters sont plus résistants aux injections pulmonaires (DELLA PORTA et coll., 1958).

5°/ *ACTION SUR D'AUTRES TISSUS*

Le B(a)P agit également sur d'autres tissus. Ainsi, son injection *intrapéritonéale* en solution colloïdale aqueuse entraîne le développement de fibrosarcomes abdominaux, d'adénomes intestinaux, utérins et mammaires (PAYNE, 1958). Chez la Souris, LOMBARD et coll., 1972 décrivent la formation de sarcomes et d'adénomes du rein avec métastases du foie. Son injection *intraveineuse* entraîne des leucémies chez la Poule (OBERLING et GUERIN, 1939a) et quelques carcinomes mammaires chez le Rat (PATAKI et HUGGINS, 1969).

L'implantation de pellets dans les *ovaires* amène la formation de cancers utérins (MULLER, 1949) ; leur implantation dans le *cerveau* entraîne la formation de gliomes (ROUSSY et coll., 1939 ; ZIMMERMAN et coll., 1943 ; HOPEWELL et WRIGHT, 1969), de méningiomes (HOPEWELL et WRIGHT, 1969) et de sarcomes (ROUSSY et coll., 1939).

Au niveau du *rein*, l'implantation de cristaux de B(a)P (OBERLING et coll., 1937) de même que l'injection huileuse de B(a)P (GAGNE et coll., 1954) aboutissent au développement d'épithéliomas malpighiens, accompagnés de métastases et d'ascites péritonéales. ROUSSY et coll. (1940), après implantation de petits fragments de B(a)P dans la *rate* du Rat, observent le développement de réticulosarcomes, ainsi que des métastases ganglionnaires.

Enfin, le B(a)P agit sur le *tissu lymphoïde* de la Souris. De quelque manière que le B(a)P soit administré, il entraîne la formation de lymphomatoses (thymiques, spléniques ou ganglionnaires,...) (CHOUROULINKOV, résultats non publiés).

6°/ EFFETS DU BENZO(a)PYRENE-B(a)P EN ASSOCIATION AVEC DES VIRUS

L'action du B(a)P peut être renforcée lorsqu'il est associé à un virus. Par exemple, il agit sur l'effet cancérogène du virus de Shope. L'inoculation du virus de Shope dans l'organisme d'un lapin normal ne provoque aucune réaction tumorale; mais badigeonnés préalablement avec du

B(a)P (LACASSAGNE et NYKA, 1937 ; FRIEDEWALD, 1942 ; ROGERS et ROUS, 1951), ces animaux développent rapidement des papillomes qui se cancérisent, entraînant leur mort. Le virus de Shope introduit dans l'organisme d'un lapin normal est donc incapable de se fixer sur les cellules épidermiques. Par contre, si elles sont préparées par l'action du B(a)P, le virus les atteint et provoque leur transformation cancéreuse.

II - EFFETS DU BENZO(a)PYRENE-B(a)P SUR LA PEAU DE SOURIS

1°/ INTRODUCTION

L'application unique ou répétée de B(a)P sur la peau de Souris, de Rat (OBERLING et coll., 1947) ou de Lapin entraîne le développement de tumeurs bénignes (papillomes) ou malignes (épithéliomas) (MAISIN et coll., 1934 ; SANNIE et coll., 1935 ; MAISIN, 1940 ; BECK et coll., 1940 ; DONIACH et coll., 1940 ; LINELL et NORDEN, 1950 ; POEL et coll., 1956 ; NORDEN, 1954, 1957b ; WYNDER et coll., 1957 ; HIEGER, 1961 ; VAN DUUREN et coll., 1968 ; VAN DUUREN, 1969 ; ROE et coll., 1970). Pour la réalisation de ces expériences, le B(a)P est employé en solution dans le benzène (VAN DUUREN et coll., 1968), le toluène (POEL, 1959), l'acétone (DONTENWILL, 1955 ; WYNDER et coll., 1957) et dans d'autres solvants organiques.

Dès les premières applications de l'hydrocarbure sur la peau de Souris, on observe une dégénérescence des glandes sébacées (SIMPSON et CRAMER, 1943). SMITH, COOPER et WYNDER (1954) ont suggéré que cette dégénérescence des glandes sébacées pouvait fournir des indications sur le pouvoir cancérogène des substances. Peu après, SUNTZEFF, COWDRY et CRONINGER (1955) renouvellent ce test pour étudier les cancérogènes chimiques. A la même époque, GUERIN observe parallèlement à la dégénérescence des glandes sébacées, une hyperplasie de l'épiderme et il propose en 1961 un test cutané rapide basé sur cette hyperplasie (GUERIN et CUZIN, 1961).

Ainsi, un hydrocarbure induit, sur la peau de Souris, des lésions précoces : *dégénérescence des glandes sébacées, et hyperplasie de l'épiderme* ; et des lésions tardives, tumorales : *papillomes et épithéliomas*.

Pour illustrer ces phénomènes et voir l'effet-dose, nous avons réalisé une série d'expériences dont ce chapitre fait état.

2°/ ACTION A COURT TERME DU BENZO(a)PYRENE-B(a)P SUR LA PEAU DE SOURIS

L'action du B(a)P sur la peau de Souris se manifeste au niveau des glandes sébacées et de l'épiderme, dans un délai de 8 jours après son application, d'où l'expression d'*action à court terme*. La méthode employée pour cette étude est bien décrite par GUERIN et CUZIN (1961) et LAZAR et coll. (1963). Nous nous sommes référés à leurs travaux.

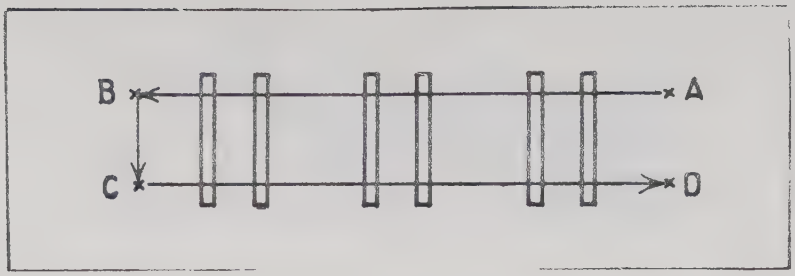
a) Matériel et méthodes

Animaux : Deux lignées de souris ont été utilisées : Souris Swiss et IC (Institut du Cancer) (GUERIN, 1964). Le choix de l'âge (50 ± 2 jours) et du sexe (femelle) est déterminé par la stabilité du cycle pileux (repos continu) à cette période (BORUM, 1954) et par la régularité de réponse des femelles (CHOUROULINKOV, LAZAR, travaux non publiés). Le B(a)P est employé sous forme de solution acétonique et à des concentrations différentes.

Technique : Les animaux sont tondus quatre jours avant le traitement. Cette précaution permet d'éliminer des souris en *repousse de poils*. La zone de peau à traiter ou badigeonner est délimitée par un tampon imprégné d'acide picrique. L'application du B(a)P est effectuée avec une seringue à insuline munie d'une virole permettant une distribution égale de la solution. Les animaux reçoivent ainsi trois applications : le lundi, le mercredi et le vendredi. Le lundi suivant, le 8ème jour après le début du traitement les souris sont sacrifiées. La peau traitée est prélevée, fixée dans du Bouin saturé, incluse dans de la paraffine et coupée. Les coupes sont étalées parallèlement sur les lames, dont chacune porte six coupes. L'hématéine-éosine-safran est la coloration utilisée pour ces expériences.

La lecture des coupes est faite *à l'aveugle* selon la technique décrite par LAZAR et coll. (1963). Les champs de lecture ne sont pas choisis, mais déterminés par le déplacement du chariot du microscope selon le schéma présenté (fig. 1.1 A).

A



B

Figure 1.1 : A - trajet de lecture microscopique.

B - lecture de l'hyperplasie.

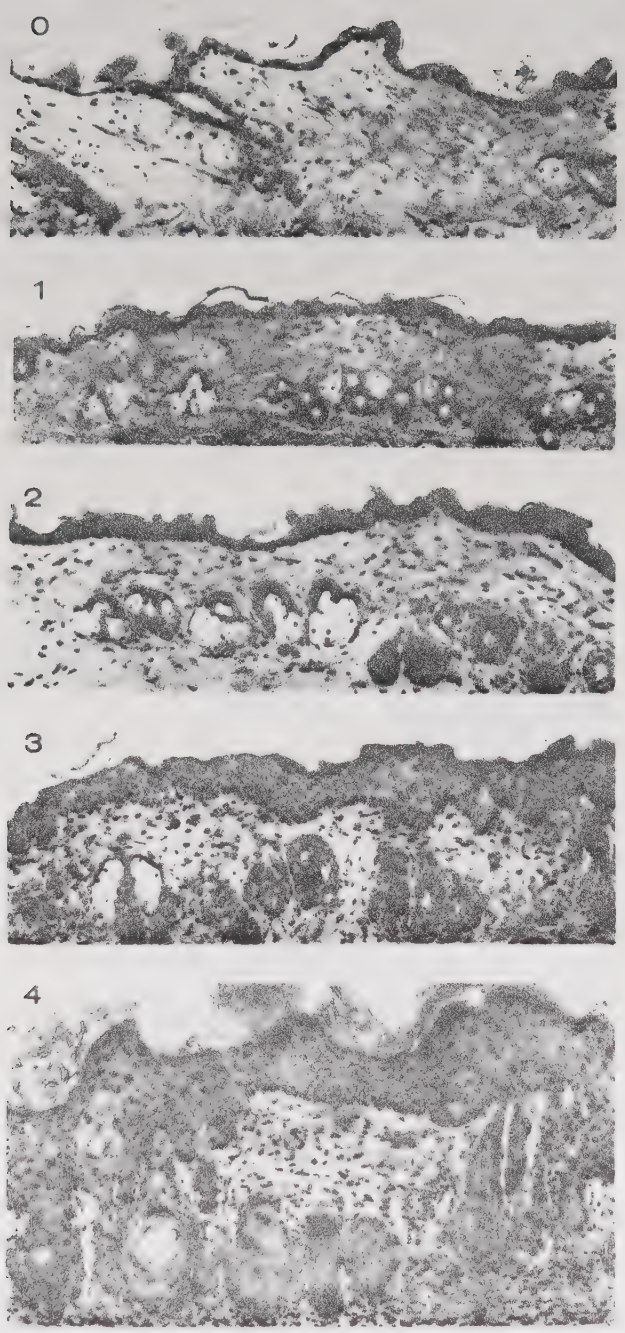


Figure 1.2 : Sections de peau traitée avec 0 µg, 75 µg, 150 µg, 300µg et 1,5 mg de B(a)P.
(d'après Guérin M. et Coll. 1961)

La numération des glandes sébacées s'effectue à l'aide d'un réticule délimitant la surface de la peau. Les glandes chevauchant 2 côtés du réticule sont comptées alors que celles qui chevauchent les 2 autres côtés sont ignorées.

L'épaisseur de l'épiderme est déterminée par des subdivisions du réticule (fig. 1.1B). La membrane basale est alignée sur un des côtés du carré marqué du réticule. L'épaisseur de la peau est appréciée suivant une échelle arbitraire. D'après la surface du carré couverte par l'épiderme, on chiffre 4 pour la totalité, 2 pour la moitié, 1 pour le quart, etc...

La lecture est toujours faite avec le même oculaire et le même objectif (oculaire 4 et objectif 7 du microscope Stiassnie). On lit ainsi 12 champs par lame et les résultats sont exprimés par la somme des glandes sébacées, ou la somme des épaisseurs.

b) Résultats

La figure 1.2a présente des sections de peau traitée par des doses croissantes de B(a)P. Il est à remarquer une diminution progressive des glandes sébacées sans que le nombre de folliculespileux soit modifié. Sur la dernière image même, aucune glande ne subsiste. Par contre l'épaisseur de l'épiderme augmente progressivement. Parallèlement une augmentation du nombre des cellules pour la même surface est constatée, qui justifie le terme d'hyperplasie épidermique, terme employé par GUERIN et CUZIN (1961).

Le tableau 1.I et la figure 1.2b donnent les résultats de l'action du B(a)P sur la peau de Souris en *fonction de la lignée des souris* et en *fonction de la concentration du B(a)P*. La réponse au traitement par le B(a)P varie d'après le niveau des glandes sébacées et l'épaisseur de l'épiderme des différentes lignées et d'après leur sensibilité.

Tableau 1.I : Nombre de glandes sébacées et épaisseur de l'épiderme après trois applications de B(a)P en solution acétonique.

Lignée de souris	Concentration du B(a)P %	Nombre de glandes sébacées (moyenne pour 25 souris)	Epaisseur de l'épiderme (moyenne pour 25 souris)
Swiss	0	19.2 ± 1.4	18.3 ± 0.4
	0.0125	18.3 ± 2.2	19.4 ± 0.4
	0.025	15.0 ± 2.3	20.1 ± 1.0
	0.05	6.7 ± 2.4	23.1 ± 3.2
I.C.	0	16.9 ± 1.1	13.5 ± 0.6
	0.05	8.2 ± 2.2	15.6 ± 2.0
	0.1	3.1 ± 1.0	21.2 ± 2.3
	0.2	0.5 ± 0.5	43.4 ± 4.4

L'*effet-dose* du B(a)P est clairement démontré au niveau de la peau par la disparition des glandes sébacées et par l'hyperplasie épidermique. Il faut noter que ces lésions sont réversibles et que si le traitement est interrompu la peau reprend son état normal au bout d'une dizaine de jours.

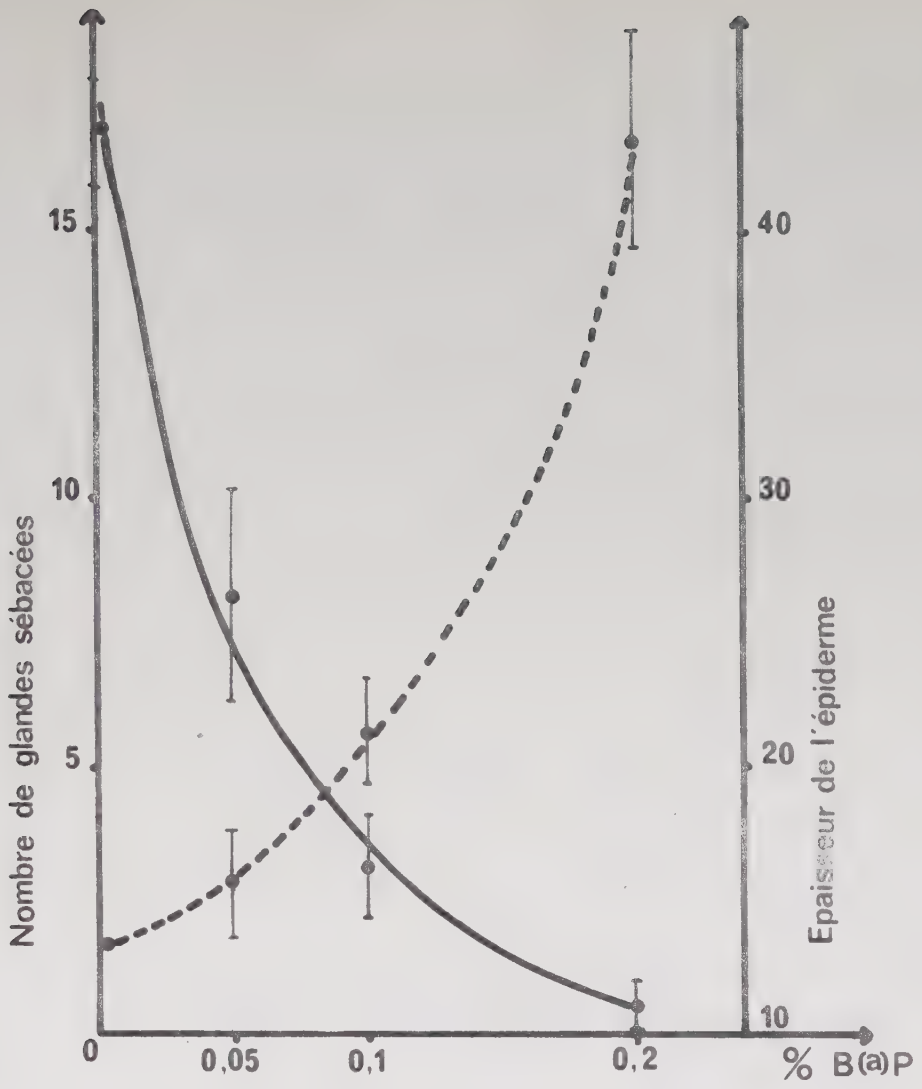


Figure 1.2b : Nombre de glandes sébacées et épaisseur de l'épiderme, en fonction de la concentration du B(a)P (en %) appliqué sur la peau de souris IC.

Quant à la pathogénèse de ces lésions seules sont avancées des hypothèses. La disparition des glandes sébacées peut s'expliquer par un effet toxique, le B(a)P, liposoluble, s'accumulant dans les glandes sébacées. Il se peut également que le B(a)P accélère la différenciation des cellules germinatives entraînant ainsi leur suppression.

Dans le cas de l'hyperplasie épidermique il peut s'agir d'un ralentissement du processus de kératinisation ou d'une diminution de la durée mitotique des cellules épidermiques. Cette dernière hypothèse semble plus probable. En effet, il a été démontré (EVENSEN, 1962) qu'après traitement par le B(a)P, un bref blocage de la synthèse d'ADN se produit, suivi aussitôt d'une augmentation de celle-ci dépassant alors le taux de synthèse normale. De même la kératinisation devient plus active. Ce phénomène est mis en évidence par l'incorporation de *soufre radioactif* (CHOUROULINKOV, travaux non publiés). Cependant la kératinisation semble plus lente que le rythme mitotique, provoquant ainsi l'hyperplasie. Il faut remarquer toutefois que la disparition des glandes sébacées et l'hyperplasie ne sont pas la conséquence de phénomènes irritatifs, car celle-ci s'accompagne habituellement d'une infiltration inflammatoire qui fait défaut dans le cas présent.

La signification de ces lésions précoces dans le processus de cancérisation des cellules sera discutée à la fin de ce chapitre.

3°/ ACTION A LONG TERME DU BENZO(a)PYRENE-B(a)P SUR LA PEAU DE SOURIS

L'action à long terme des substances cancérogènes sur la peau de Souris est étudiée en traitant les animaux par application ou badigeonnage jusqu'au développement de tumeurs bénignes (papillomes) ou malignes (épithéliomas).

a) Matériel et méthodes

Animaux : Pour cette expérience nous avons utilisé des souris blanches ICI (Imperial Chemical Industries, Angleterre), mâles et femelles, âgées de 52 (± 2) jours au début de l'expérience. Réparties en cages individuelles en macrolon, elles sont distribuées au hasard d'après le nombre de traitements. Le logement en cage individuelle évite le léchage des animaux et l'élimination de la substance (CHOUROULINKOV et LAZAR, travaux non publiés). Trois jours avant la première application de B(a)P, la peau du dos (partie postérieure) est tondue. Par la suite, cette opération est répétée chaque fois qu'une repousse des poils est constatée.

Le benzo(a)pyrène (Schuchardt-Munich), en solution acétonique, est appliqué à des concentrations différentes : 0,01, 0,05, 0,5 et 1 pour cent. Pour les trois premières concentrations, les souris reçoivent trois applications de 0,1 ml par semaine pendant 20 semaines, soit une dose totale respectivement de 0,6, 3 et 30 mg par souris. La dernière concentration (1 %) est appliquée en une seule fois, chaque animal recevant 0,3 ml, soit 3 mg de B(a)P. Le tableau 1.II présente le schéma général de l'expérience et le nombre de souris par traitement et par sexe.

Tableau I.II. Schéma général de l'expérience et répartition des animaux par traitement

Groupes	Concentration B(a)P %	Sexe	
		mâles	femelles
1	0,01	53	55
2	0,05	80	80
3	0,5	52	53
4	1	27	31
5	Acétone	10	9

Le traitement ou le badigeonnage se fait à l'aide de seringues type *"repette"* réglées pour un volume de 0,1 ml.

La date d'apparition de chaque tumeur dans la zone traitée est notée et son évolution suivie. Les animaux sont gardés jusqu'à leur mort ou sacrifiés *in extremis*. Au bout de 24 mois, l'expérience est interrompue et le peu d'animaux survivants sacrifiés. Tous les animaux sont autopsiés. Des prélèvements systématiques sont faits en vue d'une étude histologique : fixation au Bouin saturé, inclusion en paraffine, coupe et coloration à l'hématéine-éosine-safran.

b) Résultats

Incidence des tumeurs induites

Très peu d'animaux ont été éliminés par suite d'une mort précoce accidentelle ou par infection intercurrente. Le tableau I.III présente le nombre de souris retenues par groupe et le nombre de souris porteuses d'une tumeur. D'après ces résultats la réponse est identique quel que soit le sexe. Si pour la dose de 0,6 mg et la dose de 3 mg, la dernière appliquée en une seule fois, une différence entre les sexes, différence contradictoire d'ailleurs, est constatée, elle n'est pas significative.

Par contre, on constate un effet-dose sur l'ensemble des résultats finaux. Cet effet-dose n'est significatif qu'entre le groupe 1 d'une part et les groupes 2 et 3 d'autre part. Pour ces deux derniers, l'effet-dose disparaît car le traitement fut trop prolongé. Cependant, si la réponse est analysée en *fonction du temps de latence* ou temps d'apparition des tumeurs, l'effet-dose est net (tableau 1.IV et figure 1.3). Pour la plus forte concentration (0,5 %) les premiers papillomes apparaissent à la huitième semaine après le début du traitement, tandis que pour les deux autres on note un décalage respectif de 4 et 10 semaines par rapport à celle-ci. Le même phénomène se reproduit assez parallèlement quant à la transformation des papillomes en épithéliomas. D'ailleurs, l'incidence des tumeurs dans le temps n'est pas seulement liée à la concentration du B(a)P mais également au *mode d'application*. Tant que le traitement se poursuit l'incidence

Tableau I.III - Nombre d'animaux porteurs de tumeurs à la fin de l'expérience en fonction du sexe et de la dose de B(a)P

Sexe	Groupe	B(a)P dose totale (mg)	Animaux						
			Nombre retenu	avec papil.		avec epithél.		T. avec tum.	
				nbre	%	nbre	%	nbre	%
♂	1	0,60	51	9	27,0	25	73,0	34	66,7
	2	3,00	79	2	2,6	73	97,4	75	95,0
	3	30,00	49	0	0	49	100	49	100
	4	3,00*	27	3	50,0	3	50,0	6	22
♀	1	0,60	50	7	29,0	17	71	24	48
	2	3,00	80	1	1,3	75	98,7	76	95
	3	30,00	46	0	0	46	100	46	100
	4	3,00*	26	7	53,0	6	47,0	13	50
Total	1	0,60	101	16	27,6	42	72,4	58	57,4
	2	3,00	179	3	2,0	148	98,0	151	95
	3	30,00	95	0	0	95	100	95	100
	4	3,00*	53	10	53,0	9	47,0	19	36

* Dose administrée en une seule fois, les autres en 60 applications.

Tableau I.IV : Papillomes (P) et épithéliomas (ea) en pourcentage développés en fonction du temps de latence

Groupe	Conc. B(a)P %	Tumeurs	Semaines											
			8	10	12	18	22	32	42	46	50	58	64	90
1	0,01	P				4	8	11	18	21	29	35	42	57,4
		ea						3	10	15	17	23	27	42
2	0,05	P		0,6	3	29	52	64	74		75		78	95
		ea				6	23	52	68		72		74	83
3	0,5	P	3	8	45	82	99	100						
		ea			4	36	80	99	100					
4	1*	P					6	15	27	28		30		36
		ea									2	4	8	17

* Une seule application de 0,3 ml

des tumeurs monte rapidement. Dès qu'on l'arrête, la courbe, pour la concentration de 0,05 % de B(a)P, devient plus horizontale. La même courbe, pour la concentration 0,01 % est d'emblée horizontale (fig. 1.3), ce qui signifie que l'incidence des tumeurs est faible et leur temps d'apparition long. Il faut souligner enfin, que *le fractionnement de la dose de 3 mg augmente considérablement l'incidence des tumeurs*. En effet, la dose de 3 mg de B(a)P administrée en 60 applications de 0,05 mg chaque fois (concentration 0,05 %) induit les tumeurs plus tôt et avec une incidence de 95 pour cent, tandis que la même dose appliquée en une seule foie (concentration 1 %) induit les tumeurs beaucoup plus tardivement et avec une incidence de 36 pour cent seulement (fig. 1.3).

Aspect morphologique des tumeurs observées

Les animaux badigeonnés avec une solution de B(a)P développent sur la peau traitée des tumeurs bénignes (papillomes), tumeurs précoces, et des tumeurs malignes (épithéliomas), plus tardives. Dans quelques cas rares, les épithéliomas peuvent se développer directement. Toutefois, si l'animal est attentivement examiné on peut observer une hyperplasie épidermique (épaississement de l'épiderme) avant la manifestation de la tumeur.

Papillomes (fig. 1.4). Macroscopiquement ce sont de petites tumeurs uniques ou multiples de 1 à 10 mm de diamètre se développant dans la zone traitée. Généralement leur base d'implantation est limitée et mobile sur les plans

profonds. Dans quelques cas ils présentent une hyperkératinisation et prennent l'aspect de *corne*, correspondant aux tumeurs dites *kérathoacanthomes*. Quand la base d'implantation s'élargit et quand la mobilité de la tumeur diminue c'est le signe d'une évolution vers la malignité.

Histologiquement, on distingue surtout des *papillomes épithéliaux simples* (fig. 1.5), quelquefois des *papillomes adéno-sébacés* et enfin le type *acanthome*. Les premiers sont caractérisés par l'aspect du composant épidermique, un épithélium malpighien épaissi, prolifératif et desquamant, entraînant la formation de plis et de papilles conjonctifs. Les seconds sont caractérisés par la participation de glandes sébacées hypertrophiques et hyperplasiques. Enfin, l'acanthome présente une mince couche de cellules épithéliales et un énorme *bloc* de kératine avec de nombreuses cellules incomplètement kératinisées, dont les noyaux n'ont pas disparu.

Quand le papillome évolue vers la malignité les cellules tumorales commencent, en rompant la membrane basale, à envahir le tissu conjonctif sous-jacent.

Les *épithéliomas* sont des tumeurs de taille variable. Le plus souvent leur diamètre dépasse 2 cm pour atteindre parfois 4 cm. Ces tumeurs s'ulcèrent souvent et envahissent le tissu conjonctif et les muscles, elles peuvent même englober les ganglions inguinaux si leur développement est latéro-postérieur. De plus on observe des métastases surtout ganglionnaires et pulmonaires mais également rénales, hépatiques et spléniques (fig. 1.6).

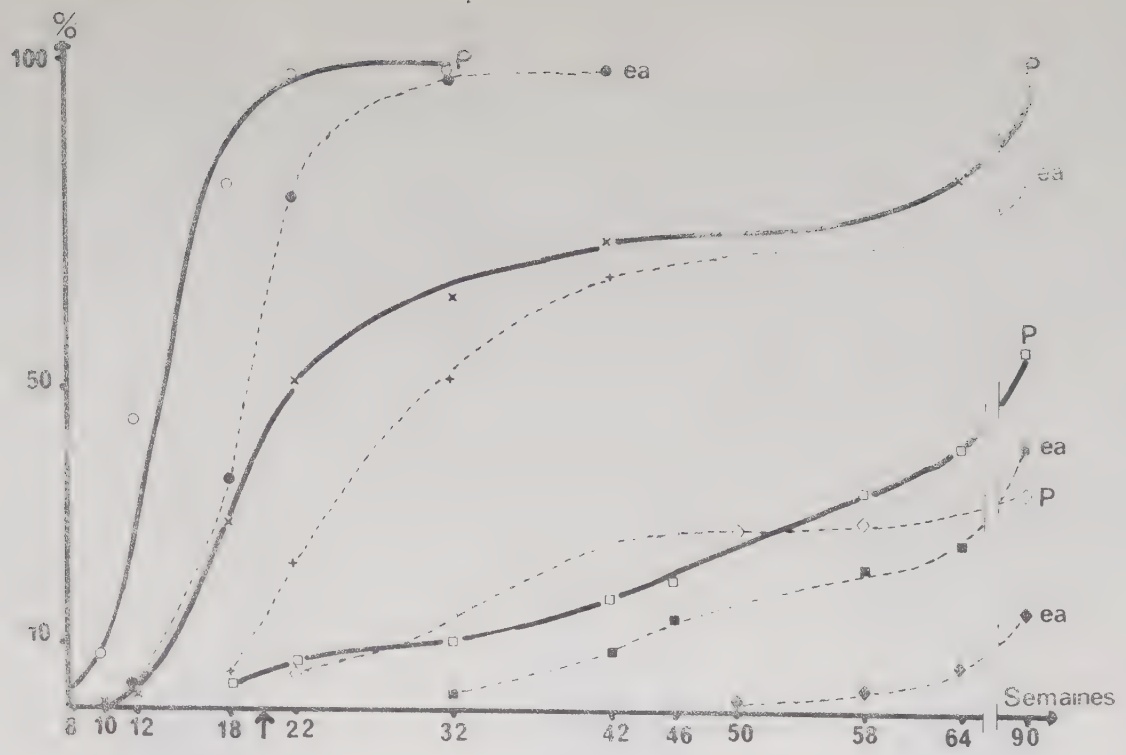


Figure 1.3 : Papillomes (P) et épithéliomas (ea) (en pourcentage) développés en fonction du temps de latence (en semaines) et de la concentration du B(a)P

P
ea — B(a)P 0,50 % (dose totale 30,0 mg)

P
ea — B(a)P 0,05 % (dose totale 3,0mg)

P
ea — B(a)P 0,01 % (dose totale 0,6 mg)

P
ea — B(a)P 1,0 % (une application - dose 3,0 mg)

↑ Arrêt du traitement

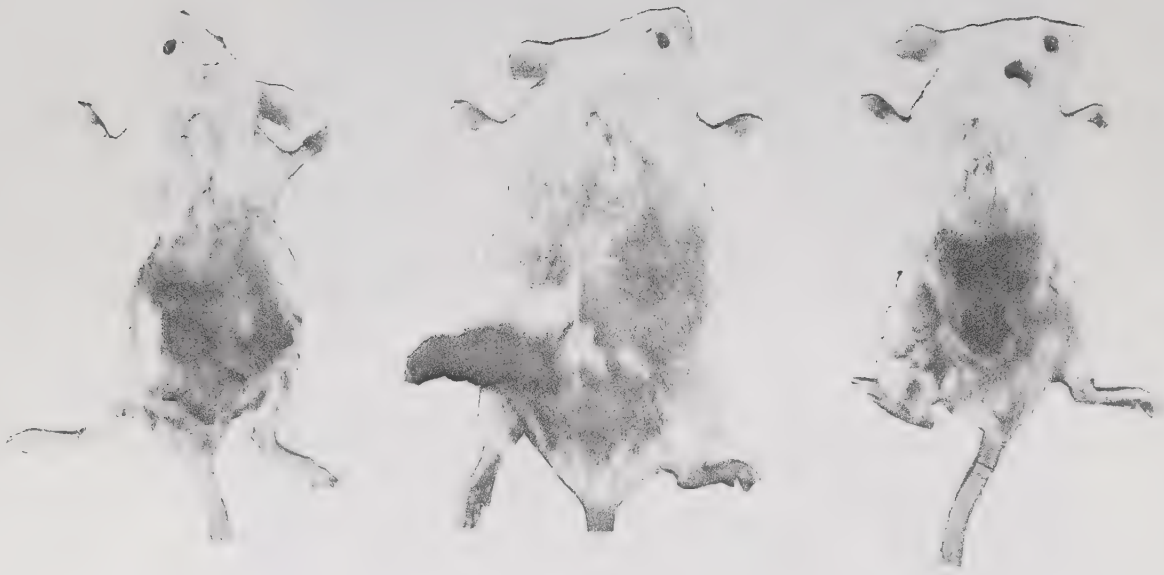
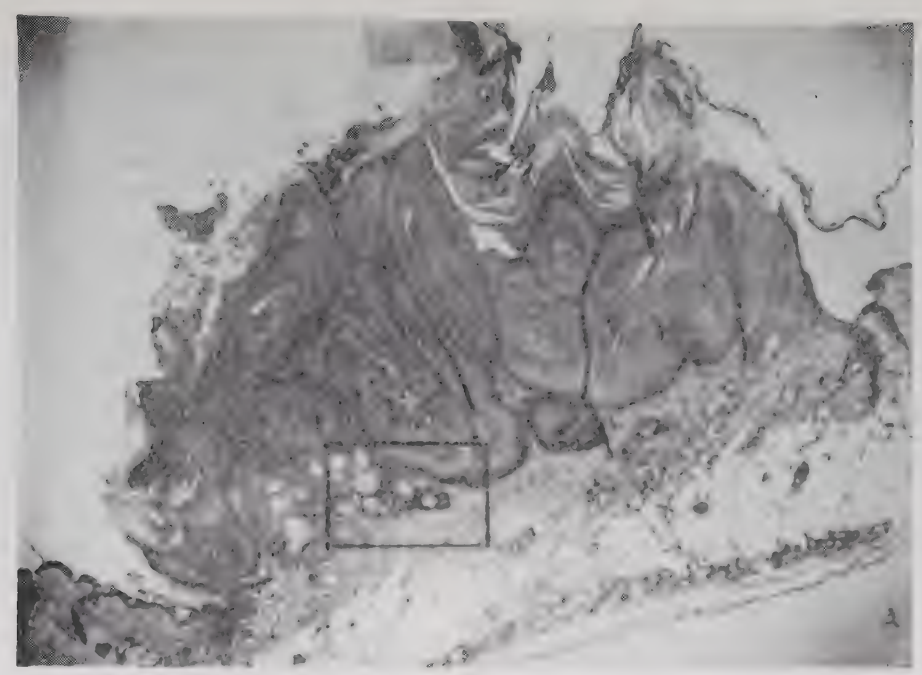


Figure 1.4 : Tumeurs induites par le B(a)P sur la peau de souris (action à long terme)

A - Papillome

B - Acanthome

C - Epithélioma



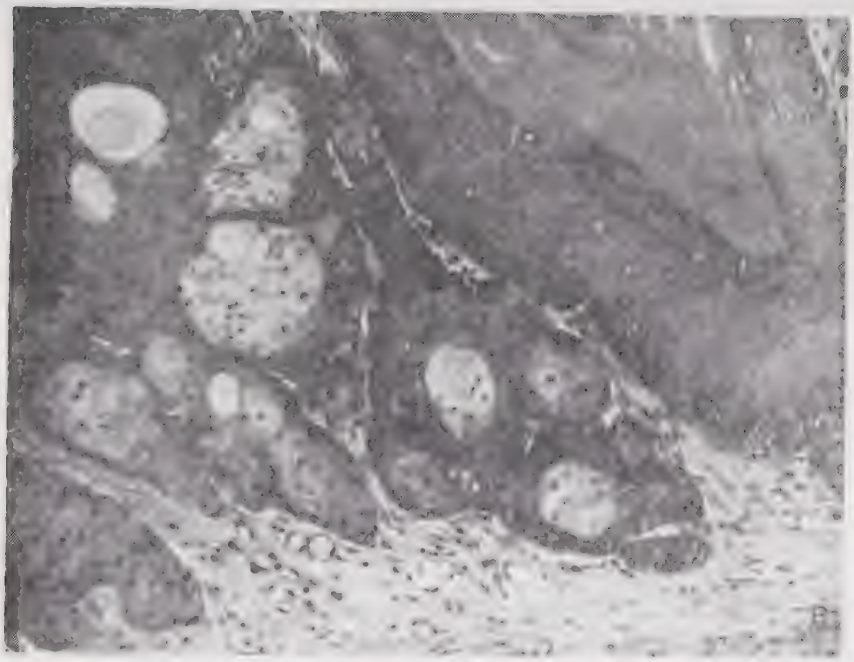


Figure 1.5 : Papillome cutané de la souris induit par le B(a)P avec participation des glandes sébacées.

a - Vue d'ensemble (x 10).

b - Détail de la zone adéno-sébacée (x 100).

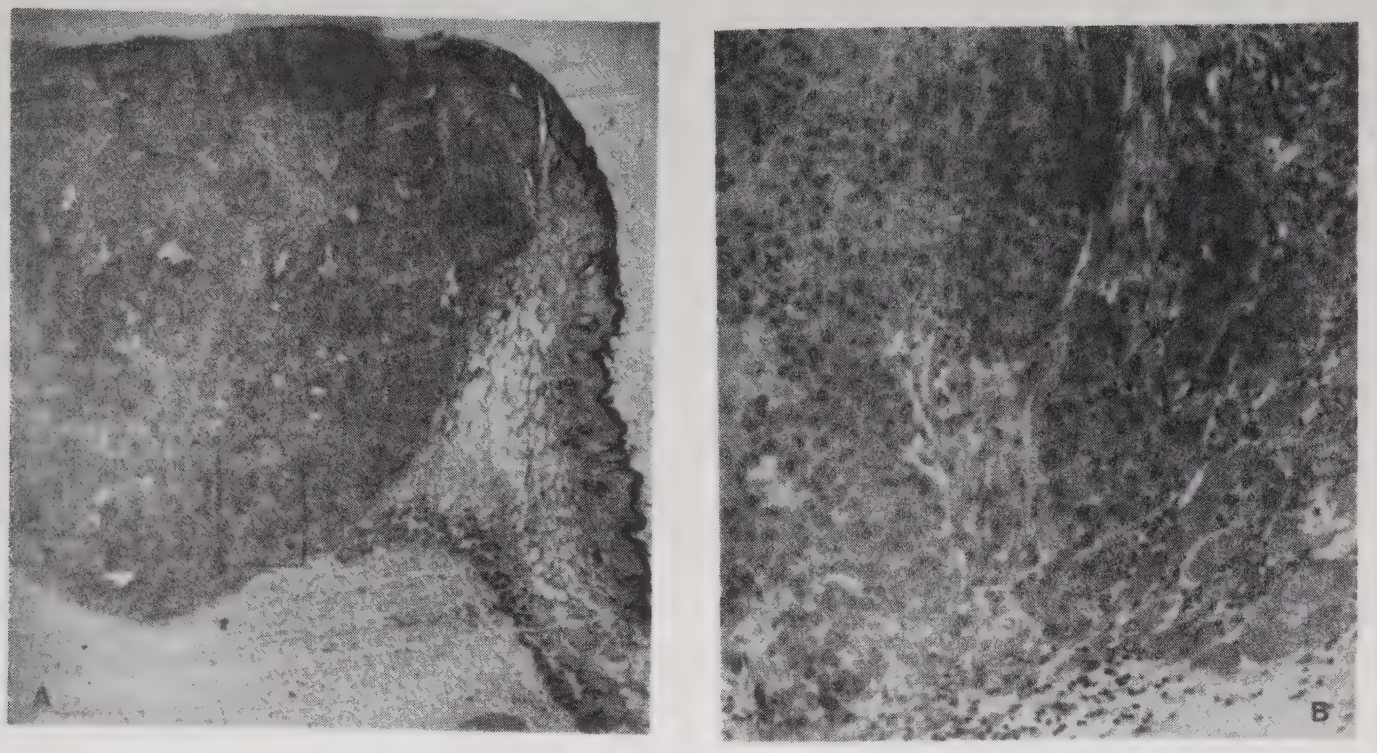


Figure 1.6 : Epithélioma malpighien envahissant le tissu conjonctif.

A - Vue d'ensemble (x 10)

B - Détail. Le muscle de la peau est dissocié (x 160).

III - DISCUSSION

La revue des effets biologiques du B(a)P et les résultats de nos expériences montrent que le B(a)P est un corps cancérogène puissant. De plus, il provoque des lésions morphologiques précoces : *destruction des glandes sébacées* et *développement d'une hyperplasie épidermique*. Ces dernières lésions sont provoquées par d'autres cancérogènes chimiques (GUERIN et CUZIN, 1961 ; BOCK, 1964 ; LAZAR et coll., 1963 ; CHOUROULINKOV et coll., 1969) et il existe une corrélation étroite entre elles et l'action cancérogène sur la peau. Le benzo(e)pyrène-B(e)P par exemple, substance non cancérogène, n'a aucun effet sur la peau. On peut admettre à priori que la destruction des glandes sébacées est due à l'effet toxique des corps cancérogènes, qui, liposolubles, s'accumulent surtout au niveau des glandes sébacées. Il n'en est pas de même pour l'hyperplasie épidermique qui est une prolifération excessive et non une destruction des cellules. Aussi l'hyperplasie peut elle être considérée comme le précurseur des tumeurs, surtout des papillomes cutanés. Cependant, l'hyperplasie épidermique, lésion réversible, n'est pas spécifique des substances cancérogènes. Les irritants tels l'ester de phorbol, composant de l'huile de croton (LIBERMAN et coll., 1968), la cantharidine (LAZAR et CHOUROULINKOV, résultats non publiés), sont également hyperplasiants mais non cancérogènes.

Conciliant les diverses observations ROUS et coll., (1941) et surtout BERENBLUM (1947, 1957) ont imaginé que la cancérisation par des substances chimiques s'effectuait en deux phases : *phase d'initiation* et *phase de promotion* (théorie de la cocarcinogénèse).

L'*initiation* est une *lésion* cellulaire non décelable mais transmissible d'une génération cellulaire à l'autre et induite par une très petite quantité d'une substance cancérogène. Si l'application de la même substance n'est pas renouvelée aucune tumeur ne se développe. Par contre l'action répétée de la substance initiatrice ou d'une autre substance (promotrice) elle-même non cancérogène, entraîne la manifestation de l'état initié sous forme de tumeurs. C'est la *promotion.*

Dans ces conditions, puisque les substances promotrices sont hyperplasiantes et pas obligatoirement cancérogènes deux faits se dégagent :

- *l'hyperplasie est plutôt liée à l'action promotrice des substances,*

- *cette hyperplasie, réversible, n'entraîne le développement de tumeurs que si elle est précédée d'une initiation.*

BERENBLUM et SHUBIK (1949) et BERENBLUM (1954) ont apporté des arguments en faveur de l'hypothèse de la cocancérogenèse et ils démontrent que l'hyperplasie n'est pas en relation avec la phase d'initiation.

En conclusion, il est probable que l'initiation soit une modification brutale et irréversible de la cellule et qu'elle se situe dans les 2-3 premiers jours après l'application de la substance initiatrice, en l'occurence le B(a)P (BERENBLUM et coll., 1947). Par contre nous ne connaissons pas le mode d'action de la substance, ni la nature de ces *lésions* primaires qui semblent être liées aux composants cellulaires dépositaires du patrimoine génétique.

Malgré cette lacune, la théorie de cocancérogenèse nous a paru une bonne hypothèse de travail. Les défauts incombent plutôt à l'imperfection du modèle expérimental qu'est l'animal. L'interférence de l'organisme au moment du traitement, la diffusion de la substance, son métabolisme ailleurs que dans le tissu cible, son élimination sont des facteurs qui ne facilitent pas les essais quantitatifs avec des substances cancérogènes. Donc un modèle expérimental simple, contrôlable, est indispensable pour étudier tous les phénomènes liés à la première phase de la transformation cellulaire par des cancérogènes chimiques. Aussi nous avons essayé de mettre au point un modèle expérimental *in vitro*, permettant, dès le début du traitement, l'étude de la transformation cellulaire d'une part et de la fixation du B(a)P par les cellules d'autre part. Les deux chapitres suivants font état de ces travaux.

DEUXIEME CHAPITRE

ACTION DU BENZO(a)PYRENE SUR LES FIBROBLASTES EN CULTURE

I - INTRODUCTION

Dans l'étude de l'action cancérogène des agents chimiques *in vivo*, nous avons adopté l'hypothèse de la transformation cellulaire en deux phases : phase d'initiation et phase de promotion. D'ailleurs, BERENBLUM (1964) a souligné l'intérêt de cette hypothèse comme *"analytical tool"* dans la recherche sur le cancer, intérêt que les travaux de notre laboratoire (CHOUROULINKOV et coll., 1969 et travaux non publiés) ont confirmé sur le plan pratique.

Cependant, pour expliquer le mode d'action des agents chimiques, ainsi que le mécanisme intime de la transformation, il manquait un modèle expérimental simple et contrôlable. Les recherches *in vitro* nous ont paru répondre le mieux au problème posé. Effectivement des études ont montré que le B(a)P a un effet toxique et un effet transformant sur les cellules en culture. Il s'agit de voir dans quelle mesure un modèle expérimental simple en culture de

tissus peut être *standardisé* et utilisé pour vérifier notre hypothèse de travail. Ce chapitre, après une revue des travaux antérieurs, fera état de nos propres résultats.

II - REVUE DES TRAVAUX ANTERIEURS

L'effet du B(a)P sur les cellules en culture de tissus se manifeste par sa toxicité et son action transformante sur les cellules.

La revue des études antérieures, nous permettra de dégager la définition de ces deux propriétés du B(a)P.

1°/ TOXICITE DU BENZO(a)PYRENE-B(a)P

La toxicité du B(a)P *in vitro* a fait l'objet de nombreux travaux, soit et surtout en culture de tissus (BERWALD et SACHS, 1963, 1965 ; ALFRED et coll., 1964 ; DI PAOLO et DONOVAN, 1967, 1969 ; HUBERMAN et coll., 1966, 1971 ; SIVAK et VAN DUUREN, 1968 ; GELBOIN et coll., 1969 ; DIAMOND, 1969, 1971), soit en cultures organotypiques (LASNITZKI, 1956 ; CHAN et coll., 1969 ; DIETZ et coll., 1971). Nous n'étudierons pas cette dernière.

Toxicité du B(a)P en culture de tissus : En 1963, BERWALD et SACHS ajoutent des disques de B(a)P à des cultures de cellules embryonnaires transformées de Souris et de Hamster. Ils n'observent aucun effet toxique, tandis que la même concen-

tration appliquée à des cellules normales entraîne la mort d'une partie de la population. Les cellules transformées sont donc plus résistantes que les cellules normales.

ALFRED et coll., (1964) concluent également que les cellules normales sont plus sensibles à l'action toxique du B(a)P que les cellules transformées.

Ces conclusions sont également confirmées par DI PAOLO et DONOVAN (1967). Une concentration de 0,5 µg/ml inhibe la croissance en nappe des fibroblastes de Hamster. Par contre, des cellules prétraitées par du B(a)P puis exposées durant 6 jours à une concentration de 100 µg/ml, prolifèrent normalement. Plus tard, DI PAOLO et coll. (1969) testent la toxicité du B(a)P sur le développement des colonies obtenues à partir d'un petit nombre de cellules.

Mais, c'est à HUBERMAN et SACHS (1966) que nous devons le terme de cytotoxicité, pour exprimer l'effet toxique du B(a)P en culture de tissus : la cytotoxicité étant, (en pourcentage), le nombre de cellules ne formant pas de colonies en référence au nombre de colonies témoins. La courbe de toxicité du B(a)P est linéaire pour des concentrations croissant de 0,1 µg à 1 µg/ml ; puis elle atteint un plateau alors que la concentration continue à augmenter. L'efficacité de clonage par contre diminue.

La toxicité augmente également avec le temps d'exposition des cellules à l'hydrocarbure. SIVAK et VAN DUUREN (1968) traitent des cellules 3T3 de Souris pendant

1, 4 et 7 jours avec du B(a)P à la concentration de 0,1 µg/ml. Ils constatent une diminution de l'efficacité de clonage.

Puis GELBOIN et coll. (1969) étudient à la fois la cytotoxicité du B(a)P sur des cellules normales et des cellules transformées par le B(a)P ; la cytotoxicité étant le pourcentage de colonies survivantes dans les boites traitées par rapport au nombre de colonies des boites non traitées. Ainsi, l'efficacité de clonage des cellules normales et transformées de hamster est respectivement de 1,2 et 27,2 pour cent. Après traitement de ces cellules avec 10 µg/ml de B(a)P, le pourcentage de colonies survivantes est respectivement de 40,5 % et 83 %. Ces dernières sont donc plus résistantes.

Enfin, KOURI et coll. (1971) définissent comme le critère de survie, la capacité qu'ont les cellules traitées de former des colonies. Leurs expériences avec des cellules de hamster chinois confirment les résultats de HUBERMAN et SACHS quant à la courbe de toxicité des celllules traitées avec le B(a)P.

En résumé, *l'effet toxique du B(a)P sur les cellules en culture de tissu se traduit par une inhibition de la croissance lorsqu'il s'agit de culture en nappe et par une diminution du nombre de colonies lorsqu'il s'agit de clonage.* N'utilisant que la méthode de clonage *nous définirons la toxicité comme étant la différence entre l'efficacité de clonage des cellules témoins et l'efficacité des cellules traitées.* Cette différence peut être exprimée en pourcentage

ou en valeur absolue. En ce qui concerne le terme *efficacité de clonage*, il sera défini dans le paragraphe suivant.

2°/ *EFFICACITE DE CLONAGE*

A/ Historique

D'après PUCK et coll. (1956), un clone est une population dont tous les membres descendent d'un organisme unique. Dans le cas de fibroblastes, le *"plating-efficiency"* ou *"colony-forming-efficiency"* exprime le pourcentage de cellules isolées qui forment des colonies visibles à l'oeil nu, 8 jours après leur ensemencement. PUCK et coll. obtiennent ces clones de deux manières : soit en ensemençant des cellules humaines isolées, 5, 10, 50, 100 cellules HeLa dans un milieu de culture enrichi et additionné d'une solution d'agar à 1 % ; soit en ensemençant des cellules HeLa sur une couche de cellules irradiées (PUCK, 1955 ; PUCK et coll., 1956). Dans les deux cas, le *plating-efficiency* est pratiquement de 100 %.

YASUMURA et coll. (1966) obtiennent un *plating-efficiency* de l'ordre de 5 % en clonant des cellules surrénaliennes de Souris en milieu synthétique F10 enrichi de sérum de cheval, de sérum embryonnaire de veau et de gélose.

Pour DI PAOLO et coll. (1967), le terme de *plating-efficiency* désigne le nombre de colonies formées pour 1000 cellules embryonnaires de hamster syrien ensemencées à la concentration de 10^4, 10^5, 10^6 cellules par boite, en

milieu gélosé et sur couche d'agarose. Puis, en 1969, ils calculent directement le *plating-efficiency* en divisant le nombre moyen de colonies par boite par le nombre de cellules ensemencées et en multipliant le résultat par 100. Dans ce cas, ils ensemencent 300, 500, 1000 cellules embryonnaires de hamster syrien par boite, sur couche nourricière. Le *plating-efficiency* varie de 6 à 7 % pour les cellules normales. MARQUARDT et coll. (1972) obtiennent, en clonant des cellules dérivées de la prostate ventrale de souris C_3H, des *plating-efficiencies* atteignant 25 %.

Dans la littérature une autre expression est souvent substituée au *plating-efficiency* : le *cloning-efficiency* (BERWALD et SACHS, 1965 ; HUBERMAN et SACHS, 1966 ; SIVAK et VAN DUUREN, 1968 ; MONDAL et HEIDELBERGER, 1970). BERWALD et SACHS (1965) et HUBERMAN et SACHS (1966) le définissent comme étant le *pourcentage de colonies se développant à partir d'un certain nombre de cellules ensemencées*. Ce chiffre est obtenu par comptage direct des colonies dans les boites où elles ne sont pas confluentes. Lorsqu'il y a confluence, les boites sont éliminées. Dans la pratique, des fibroblastes de Hamster sont ensemencés sur une couche de cellules irradiées dite couche nourricière (fibroblastes de Rat). Afin de pallier aux variations du *cloning-efficiency* 10^3, 5.10^3, 10^4 cellules par boite sont ensemencées dans du milieu Eagle enrichi par des acides aminés et du sérum de veau. Dans chaque groupe 8 à 16 boites sont ensemencées. Le *cloning-efficiency* des cellules normales varie de 10 à 12 % selon

les expériences ; il diminue par effet toxique de la substance lors de la transformation cellulaire. Le *cloning-efficiency* est employé ici dans le même sens que le *plating-efficiency*.

Le développement d'une microtechnique de clonage par MONDAL et HEIDELBERGER (1970) donne un sens plus restreint au terme de *cloning-efficiency*. Des cellules de prostate embryonnaire de souris C_3H sont ensemencées sur lamelle, cette dernière est alors cassée en autant de fragments, que de cellules colbes. Chaque fragment portant une cellule est mis dans une boite à pétri individuelle. Dans ce cas, le *cloning-efficiency* est le pourcentage de colonies obtenues à partir de cellules réellement isolées. Ainsi, les auteurs obtiennent une efficacité de clonage de 70 %.

Mac PHERSON en 1970, alors qu'il établit une revue bibliographique sur la transformation des cellules par les cancérigènes chimiques, substitue le terme de *colony-forming-efficiency* au terme de *cloning-efficiency*, qu'il continue à employer par la suite (1971).

Enfin, ROBB (1970) en microclonage de cellules de mammifères emploie le terme de *cloning-efficiency* paraissant plus restrictif que celui de *plating-efficiency*.

En conclusion, il semble donc que les termes de *plating-efficiency*, *colony-forming-efficiency* et *cloning-efficiency* sont indifféremment employés pour exprimer quantitativement (en pourcentage) le nombre de colonies obtenues à partir d'un petit nombre de cellules ensemencées. Ceci permet des étuaes comparatives de l'action de divers agents chimiques sur les cellules.

En ce qui nous concerne, nous adoptons le terme d'*efficacité de clonage* (expression déjà utilisée par MONTAGNIER, 1969), terme qui *représente le nombre de colonies formées en fonction du nombre de cellules mises en culture et exprimé en pourcentage*. Toutefois, il faut faire la réserve qu'un certain nombre de colonies dérivent probablement de deux ou trois cellules, dans le cas où celles-ci se déposent côte à côte au fond de la boite. Cette probabilité augmente avec le nombre de cellules pour la même surface, mais elle est négligeable pour les suspensions utilisées dans nos expériences.

B/ Techniques de clonage

Dans les conditions habituelles de culture, les cellules isolées non transformées sont incapables de former des colonies. L'efficacité de clonage ne dépasse pas 0,10 % dans les meilleures conditions expérimentales (Mac PHERSON, 1970). Ensemencées au dessous d'un certain nombre, les cellules dégénèrent. Aussi, ont-elles besoin d'un milieu conditionné pour se multiplier (EARLE et coll., 1954). Par exemple, EARLE emploie le milieu nutritif dans lequel des cellules vivantes se sont déjà développées. Ce milieu appelé milieu conditionné, suppléant à l'insuffisance du milieu normal, permet à une cellule isolée de croître jusqu'au moment où elle sera capable de se diviser (EARLE, 1954 ; PUCK et MARCUS, 1955). Mais la nature des facteurs du milieu favorisant la croissance cellulaire est encore inconnue.

Selon les techniques employées, le *conditionnement* du milieu est obtenu de diverses manières :

Certains utilisent une *couche de cellules appelée couche nourricière*. Cette dernière est obtenue en irradiant les cellules (PUCK et MARCUS, 1955 ; SACHS et coll., 1962, 1972 ; DI PAOLO et coll., 1969a ; HEIDELBERGER, 1969), ou en les traitant à la mitomycine C (Mc PHERSON, 1971). L'irradiation des cellules par les rayons X (4000 à 5000 R) ainsi que le traitement à la mitomycine C a pour but d'arrêter l'activité mitotique des cellules sans toutefois inhiber leur métabolisme, dont les produits vont permettre aux cellules isolées de se multiplier sur place en donnant des colonies. Il faut noter que l'emploi de la mitomycine C semble beaucoup plus simple.

D'autres auteurs clonent les cellules sur un milieu *semi-liquide à base d'agarose* (PUCK et MARCUS, 1956 ; Mc PHERSON et MONTAGNIER, 1964 ; DI PAOLO et coll., 1967) souvent enrichi par d'autres substances comme le bactotryptose phosphate (BTP) (MONTAGNIER, 1969). L'agarose aide également la croissance des cellules isolées. Son addition à un milieu liquide augmente sa viscosité, évitant ainsi la diffusion d'éléments nutritifs, dont la cellule peut avoir besoin. En même temps, l'agarose retient les cellules qui ont tendance à migrer. L'addition d'extrait embryonnaire de veau ou de bactotryptose phosphate conditionne le milieu par l'apport respectif de protéines et de nucléotides puriques.

Enfin, l'emploi de milieu *"pré-inoubé"* déjà utilisé par EARLE et coll. (1954) et qui n'est que le surnageant d'une culture confluente, est préconisé par KOURI et LUBET (1971). Ce milieu enrichi des substances rejetées par les cellules porte en lui des éléments indispensables à la multiplication des cellules.

D'après le procédé retenu pour conditionner le milieu, plusieurs techniques de clonage ont été élaborées.

a) La technique sur couche nourricière de cellules

La couche nourricière se compose soit d'une nappe de cellules irradiées, soit d'une nappe de cellules traitées à la mitomycine C.

- Clonage sur nappe de cellules irradiées :

C'est la méthode qu'emploient HUBERMAN et SACHS (1966) et DI PAOLO et coll. (1969a).

Préparation des cellules irradiées : Les fibroblastes de Rat d'une culture secondaire de 2 jours sont irradiés à 4000 - 5000 R par un appareil à Rayons X (CGR, 250 KV - 8 ampères). Deux heures après, les cellules sont décollées et ensemencées à raison de 60 000 cellules par boite de Pétri de 50 mm de diamètre. Ces cellules irradiées sont employées immédiatement après qu'elles se soient fixées sur le fond de la boite ou peuvent être conservées pendant 15 jours. Dans ce cas-là, elles sont laissées 24 heures à 37°, puis transportées dans une étuve à CO_2 (10 %) réglée à 24°.

Clonage : Pour le clonage, 300, 500 et 1000 cellules de Hamster dans 2 ml de milieu Dulbecco avec 10 % de sérum embryonnaire de veau (SEV), sont ajoutées dans les boites de pétri contenant les cellules nourricières. L'addition du B(a)P se fait 24 heures après. Les boites de Pétri sont incubées pendant 8-10 jours à 37° dans une atmosphère contenant 10 % de CO_2. Enfin, les cellules sont fixées directement dans les boites pendant 20 minutes à l'alcool méthylique et colorées pendant 20-30 minutes au May-Grünwald-Giemsa. L'observation des colonies se fait à l'oeil nu ou à la loupe binoculaire à faible grossissement.

- Clonage sur nappe de cellules traitées à la mitomycine C : technique de Mc PHERSON et BRYDEN (1971)

Une nappe de cellules confluentes ou semi-confluentes de fibroblastes embryonnaires de Souris est traitée 12 heures à la mitomycine C, à la dose de 2 µg pour 10^6 cellules. Le lendemain, les cellules une fois décollées sont réensemencées à raison de 10^5 cellules par boite.

Vingt quatre heures après, les cellules à cloner sont ensemencées sur la *couche nourricière* à raison de 200 cellules par boite. Le milieu utilisé est le milieu Dulbecco enrichi de 10 % de sérum de veau préalablement chauffé à 56° pendant 30 minutes. Les boites sont incubées 5 jours à 37° en présence d'un mélange d'air et de gaz carbonique à 10 %. Les colonies sont fixées et colorées au May-Grünwald-Giemsa, comme indiqué ci-dessus.

D'après les auteurs, l'efficacité de clonage est quatre fois supérieure à celle obtenue en clonant les cellules sur une couche de cellules irradiées. Toutefois, la mitomycine C en bloquant l'activité mitotique des cellules de la couche nourricière, a certainement une action sur les cellules à cloner.

b) La technique de clonage sur agarose, en milieu semi-liquide

Employée par SANDERS et coll. (1964) pour l'étude de la transformation des cellules de Hamster de lignée BHK 21 infectée par le virus du polyome, cette technique fut modifiée par Mc PHERSON et coll. (1964) et MONTAGNIER (1966) : ainsi s'applique-t-elle aussi bien aux cellules transformées depuis plusieurs générations qu'aux cellules nouvellement transformées. Par contre, elle reste inefficace dans le cas de cellules normales.

Une couche support compacte d'agarose à 0,45 % est coulée à 43° (température de fusion de l'agarose) sur le fond des boites de Pétri sur une épaisseur de 1 cm. Pendant que la couche se solidifie les cellules à cloner sont préparées à la concentration de 1000 à 500 000 pour 1,5 ml de milieu. Elles sont ajoutées au dernier moment au mélange semi-fluide formé par du milieu Eagle, enrichi de BTP (10 %), de sérum de veau (10 %) et de gélose à 0,30 % et maintenu à 43°. L'incubation se fait à 37° (cette température permet la gélification de la couche supérieure), en atmosphère

humide et en présence de 5 % de CO_2. Les colonies sont comptées au microscope inversé à faible grossissement, 10 à 12 jours après l'ensemencement. Ces colonies sont de forme sphérique, très denses et bien délimitées. L'efficacité de clonage atteint, d'après les auteurs, jusqu'à 40,5 % pour les cellules de Hamster transformées ; par contre elle n'est que de 2,2 % pour les cellules BHK 21/13 (SANDERS et coll., 1964).

c) Technique de microclonage

Cette technique très minutieuse à été mise au point par MONDAL et HEIDELBERGER (1970). Elle diffère des autres techniques par le fait qu'une seule cellule est mise à cloner sur un fragment de lamelle, sans avoir la possibilité d'interférer avec une autre cellule.

Un petit nombre de fibroblastes (400) provenant d'une culture de prostate ventrale de Souris adulte C_3H, est ensemencé sur 20 à 25 petits morceaux de lamelles de 1 mm^2 de surface disposés sur le fond d'une boite de Pétri en plastique. Les fragments sont examinés minutieusement 16 heures après. Ceux qui portent une seule cellule sont rincés avec le milieu utilisé (Eagle + 10 % de sérum embryonnaire de veau) afin de chasser les cellules susceptibles d'être restées accrochées sur les bords ou sous la lamelle ; puis ils sont transférés dans une boite de Pétri individuelle contenant du milieu complet. Les substances à tester sont alors ajoutées. Les boites sont incubées à 37° et examinées journellement afin de suivre la multiplication des cellules

à partir de la cellule initiale. Au 10ème jour, les colonies sont fixées, colorées et observées au microscope. L'efficacité de clonage pour les témoins, en présence du solvant DMSO, s'élève à 72 %.

d) Technique en milieu "pré-incubé" de KOURI et LUBET (1971)

KOURI et LUBET (1971) s'inspirant de EARLE ont mis au point cette technique pour l'étude quantitative de la transformation des cellules pulmonaires de hamster chinois. Les cellules à cloner sont ensemencées dans du milieu *pré-incubé*. Ce milieu est le surnageant de cellules cultivées en nombre élevé (170 000 cell/ml) dans du milieu Dulbecco et prélevé 24 heures après leur mise en culture. Il est conservé au froid (+ 4°) avant son emploi ; les cellules à cloner sont ensemencées à la concentration de 150 et 300 cellules par boite de Pétri contenant du milieu *pré-incubé*. Quelques heures après, lorsqu'elles sont collées, les substances cancérigènes sont ajoutées de même que le sérum embryonnaire de veau (15 %). Les cellules sont incubées à 37°, pendant 10 à 13 jours en présence de CO_2 à 5 %.

Pour des faibles concentrations de B(a)P (0,6 µg/ml) la toxicité est faible. Pour des concentrations comprises entre 1,2 et 4,8 µg/ml elle est de 40 %. A partir de 5 µg/ml la toxicité est très élevée (50 %).

III - MATERIEL ET METHODES

1°/ *MATERIEL*

Fibroblastes : Notre choix s'est porté sur des fibroblastes embryonnaires de rat Wistar et de hamster doré. Il semble qu'aucun virus ne se développe sur les premiers (SACHS, MEDINA et BERWALD, 1962) et la transformation spontanée est très rare chez les seconds.

Les embryons des 2 espèces âgés de 12 jours environ proviennent de femelles gestantes élevées en isolateurs dans l'élevage de l'Institut, assurant ainsi une aseptie optimale. Après les avoir anesthésiées, les femelles sont saignées à blanc et les embryons prélevés stérilement. Après deux lavages au PBS les embryons sont découpés en fragments qui à leur tour sont lavés pendant 5 minutes avec agitation dans du PBS chauffé à 37° pour éliminer les hématies. Cette opération terminée, les fragments agités en présence de trypsine à 0,25 %, à 37°, subissent une digestion trypsique. Le surnageant de la première digestion de 20 minutes est éliminé, tandis que les surnageants des trois digestions suivantes de 10 minutes chacune, sont conservés à + 4°, température stoppant l'effet de la trypsine. A la fin, l'ensemble des surnageants est filtré à travers de la gazè stérile pour éliminer des petits fragments ou agglomérats cellulaires, puis centrifugé pendant 5 minutes à 1000 t/mn (centrifugeuse Jouan). Le culot, représentant les cellules, est resuspendu dans du milieu additionné de sérum. Après comptage des

cellules, cette suspension sert pour l'établissement des *cultures primaires*. A cet effet, dix millions de cellules dans 10 ml de milieu sont ensemencées par boite de Pétri (Falcon) de 10 cm de diamètre.

Dans toutes les expériences de clonage, les cellules proviennent du premier passage (P_1) de la culture primaire (P_0). Ceci permet une sélection des types cellulaires. En effet, les cellules épithéliales se raréfient au cours des repiquages. Par contre, pour éviter une transformation spontanée les repiquages des cultures secondaires ne sont pas continués. Effectivement, beaucoup de cellules normales se transforment spontanément en culture de tissus après un certain nombre de passages (SANFORD, 1967 ; BARKER et coll., 1970).

Les cellules de la culture primaire (P_0) après 4-5 jours d'incubation sont utilisées pour les cultures secondaires. Le milieu est remplacé par 5 ml d'une solution de trypsine à 0,25 % chauffée à 37°. Une minute après 4 ml de cette solution sont retirés et remplacés par le même volume de milieu. Ainsi la trypsine se trouve diluée à 0,05 %. Les cellules se décollent 13 à 15 minutes après. Le décollement peut être favorisé à l'aide d'une pipette par aspiration et rejet doux du milieu.

Les cellules à cloner sont ensemencées à des concentrations de 200, 400, 600 cellules par boite de Pétri en plastique Falcon (60 x 15 mm). Le nombre de boites est de 8 à 15 par série, réparties au hasard, afin de permettre une interprétation statistique des résultats.

Les milieux de culture : Après divers essais effectués avec du milieu 199 (Difco), du milieu Eagle (Grand Island Biological Company, New-York) et du milieu Dulbecco (Gibco) additionnés soit de sérum de veau (SV), ou de sérum embryonnaire de veau (SEV), soit de bactotryptose-phosphate (BTP), nous avons finalement adopté le milieu Dulbecco. Ce milieu synthétique mis au point par DULBECCO et coll. (1959), SMITH et coll. (1960) a une composition chimique identique à celle du milieu Eagle, mais la concentration en glucose et acides aminés est plus élevée. Le tableau suivant met en évidence les différences quantitatives de ces deux milieux (tableau 2.I). Le milieu Dulbecco est livré sous forme de poudre en sachets dosés pour 10 litres. Les sachets sont conservés à 4° à l'obscurité et au sec. L'eau bidistillée est utilisée pour la préparation du milieu. Le bicarbonate de soude ainsi que les antibiotiques sont ajoutés pendant la dissolution de la poudre. Elle est favorisée par une agitation magnétique pendant 60 minutes environ. Le milieu est ensuite filtré sur membranes Millipore de 45 µ et 22 µ puis distribué en flacons stériles de 50, 100 et 250 ml qui sont conservés à 4°.

Le sérum de veau (SV) (laboratoires Sorga, Paris) est utilisé, dans la proportion de 20 %, pour enrichir le milieu lors de l'ensemencement des fibroblastes de Rat.

Le sérum de veau, prélevé aseptiquement, stérilisé par filtration sur membranes Millipore, et congelé à - 30° est livré en flacons de 400 ml. Dès l'arrivée au laboratoire, il est décongelé à la température ambiante, puis réparti stérilement dans des flacons de 40 ml que l'on range à - 20° jusqu'au moment de l'emploi.

Le sérum embryonnaire de veau (SEV). Pour les cultures de fibroblastes de Hamster, dont la multiplication n'est pas aussi active que celle des fibroblastes de Rat, nous avons dû substituer au sérum de veau, le sérum embryonnaire de veau à concentrations variables selon le type de fibroblastes et les techniques employées. Nous en reparlerons en temps utile. Après avoir testé des lots de provenances diverses, nous avons opté pour le sérum embryonnaire congelé en flacons de 500 ml de la maison Gibco (Flobio, Courbevoie, 92). Les flacons sont décongelés lentement à la température ambiante. Le sérum est alors réparti stérilement en flacons de 40 ml stockés au réfrigérateur à - 20°.

Les antibiotiques sont ajoutés au milieu lors de sa préparation. La pénicilline (laboratoire Roger Bellon) et la streptomycine (Spécia) sont systématiquement employées, à raison de 200 000 unités (de pénicilline) et de 50 mg de streptomycine pour 1 litre de milieu.

TABLEAU 2.1 : TABLEAU COMPARATIF DES DEUX MILIEUX DE CULTURE.

A - MILIEU "MINIMUM ESSENTIAL MEDIUM" (MEM) DE EAGLE

Constituants	mg/L	Constituants	mg/L
NaCl	6800.0	L-Glutamine	292.0
KCl	400.0	L-Isoleucine	52.5
NaH_2PO_4. H_2O	140.0	L-Leucine	52.4
$MgSO_4$ $7H_2O$	200.0	L-Lysine	58.0
$CaCl_2$ (anhyd.)	200.0	L-Methionine	15.0
Glucose	1000.0	L-Phenylalanine	32.0
L-Arginine	105.0	L-Threonine	48.0
L-Cystine	24.0	L-Tryptophane	10.0
L-Histidine	31.0	L-Tyrosine	36.0
L-Valine	46.0	Pyridoxal HCl	1.0
Choline Cl	1.0	Riboflavine	0.1
Acide Falique	1.0	Thiamine HCl	1.0
i-inositol	2.0	Rouge de phénol	10.0
Nicotinamide	1.0	$NaHCO_3$	2200.0
D-Ca pantathenate	1.0		

D'après Eagle H : Science 130 : 432 (1939)

B - MILIEU EAGLE MODIFIE PAR DULBECCO

Constituants	mg/L	Constituants	mg/L
NaCl	6400.0	L-Histidine HCl. H_2O	42.0
KCl	400.0	L-Isoleucine	105.0
$CaCl_2$ (anhyd.)	200.0	L-Leucine	105.0
$MgSO_4$ $7H_2O$	200.0	L-Lysine HCl	146.0
NaH_2PO_4 H_2O	124.0	L-Methionine	30.0
Glucose	4500.0	L-Phenylalanine	66.0
$Fe(NO_3)_3$ $9H_2O$	0.1	L-Threonine	95.0
L-Arginine NCl	84.0	L-Tryptophane	16.0
L-Valine	94.0	Pyridoxal HCl	4.0
Glycine	30.0	Thiamine HCl	4.0
L-Serine	42.0	Riboflavine	0.4
L-Cystine	48.0	Acide Folique	4.0
L-Tyrosine	72.0	i-Inosital	7.2
Choline Cl	4.0	L-Glutamine	580.0
Nicotinamide	4.0	Rouge de phénol	15.0
D-Ca pantathenate	4.0	$NaHCO_3$	3700.0

D'après Dulbecco R, Freeman G. : Virology 8 : 396 (1959)

Smith J.O., Freeman G., Vogt M., Dulbecco R. : Virology 12 : 185-196 (1960)

Le gaz carbonique. Toutes les boites de Pétri sont incubées à 36-37° dans des étuves ou caissons de Lwoff hermétiquement clos, en atmosphère humide et en présence d'un courant de gaz carbonique à 10 %. Le mélange gazeux est livré dans des bouteilles sous-pression (Compagnie Française des Produits Oxygénés). Il a pour but de maintenir constant le pH du milieu. A l'arrivée et à la sortie des étuves, le mélange barbote dans une solution de sulfate de cuivre à 0,1 % dans l'eau, en vue de contrôler le débit du gaz et de le stériliser.

Solution de benzo(a)pyrène. Le B(a)P (Schuchardt, Munich) étant insoluble dans l'eau a été dissous dans l'acétone à froid. Les solutions sont préparées au moment de l'emploi, car le B(a)P se décompose très rapidement. La concentration du solvant dans le milieu a été choisie expérimentalement, d'après son effet toxique propre sur les cellules. L'acétone a été préféré au DMSO car ce dernier est très toxique pour les cellules dès 0,1 % (tableau 2.II, figure 2.1). La toxicité de l'acétone est plus faible. Une concentration de 0,5 % n'inhibe pas la croissance des colonies et n'altère pas la morphologie des cellules cultivées.

Le B(a)P en solution acétonique donne un milieu limpide jusqu'à une concentration de 10 µg/ml. Au-delà, le milieu est trouble. Nous avons néanmoins étudié l'influence du B(a)P jusqu'à 40 µg/ml en tenant compte de ce fait.

Tableau 2.II. Toxicité du diméthylsulfoxide pour les fibroblastes de Rat (1600 cellules/boite - 5 boites de Pétri).

% Concentr. DMSO	0	0,1	0,25	0,5	1	2
Nombre de colonies	226	227	179	88	24	1*
Efficacité de clonage %	2,83	2,84	2,24	1,10	0,30	0,02

* 4 boites

2°/ METHODES

S'inspirant des travaux publiés et revus ci-dessus, ainsi que de nos essais préliminaires, nous avons retenu trois techniques basées sur l'emploi ou non d'une couche nourricière. Le tableau 2.III permet d'ailleurs de comparer les possibilités des trois méthodes.

Tableau 2.III Efficacités de clonage (en %) obtenues avec des fibroblastes de Hamster et de Rat selon les techniques employées
(300 cellules ensemencées par boite)

Fibroblastes	Milieux de culture		
	Dulbecco enrichi (10 % SEV) + couche nourricière	Dulbecco enrichi (20 % SEV)	Dulbecco enrichi (20 % SEV) + milieu conditionné (a, a)
Hamster	18,5	3,7	6,3
Rat	35	27,9	28,7

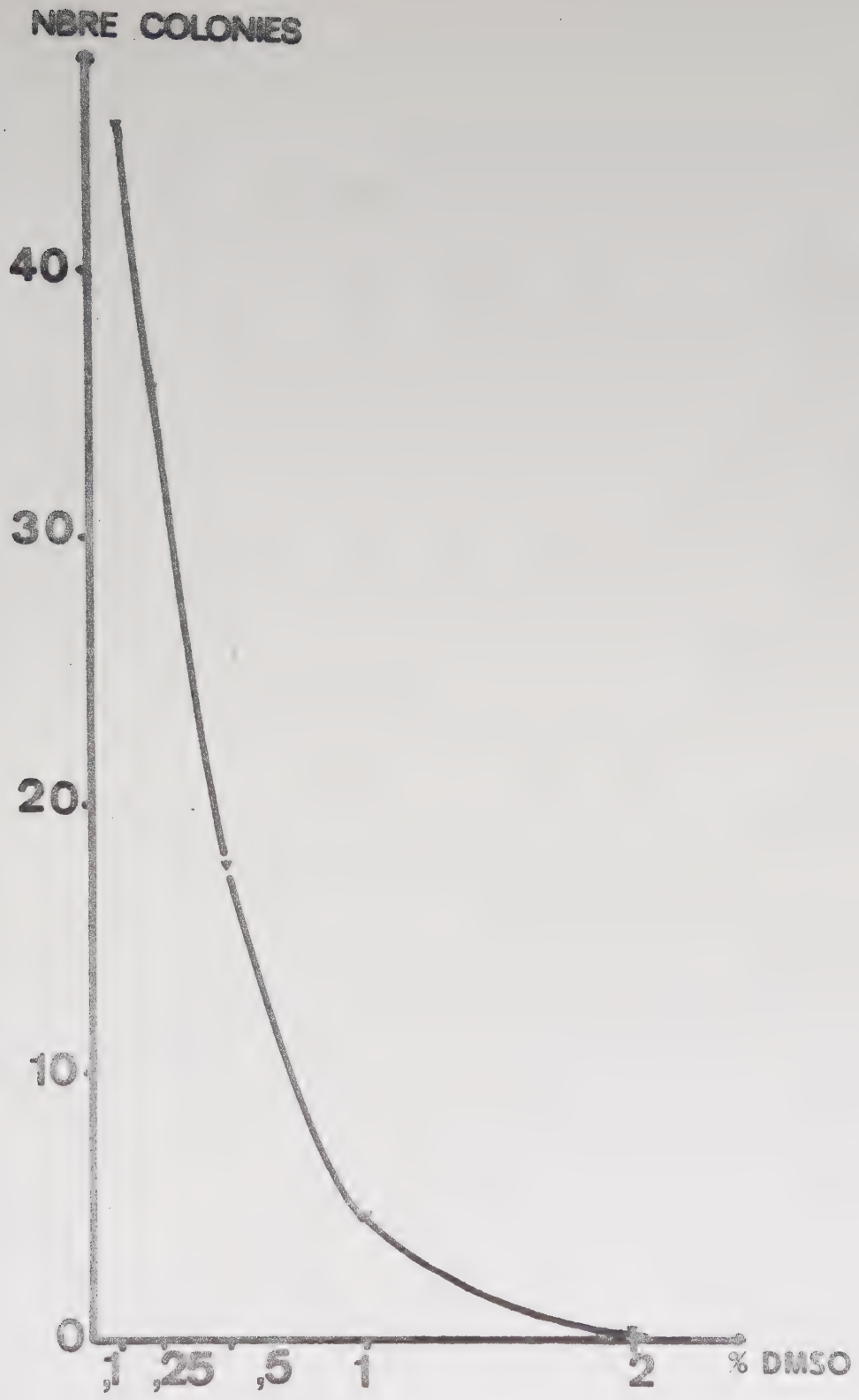


Figure 2.1 : TOXICITE DU DMSO POUR LES FIBROBLASTES EMBRYONNAIRES DE RAT. NOMBRE DE COLONIES FORMEES EN FONCTION DE LA CONCENTRATION DU DMSO DANS LE MILIEU, EXPRIME PAR BOITE.

a) Clonage sur couche nourricière de cellules irradiées

Nous avons adopté cette technique car elle donne de bons résultats avec les fibroblastes de Hamster et les fibroblastes de Rat et permet ainsi de comparer la réponse des deux types de colonies à l'action du B(a)P. C'est la technique classique mise au point par DI PAOLO et décrite plus haut (pages 34 - 35). Pour une concentration de 300 cellules par boite l'efficacité de clonage est de 18,5 % pour les fibroblastes de Hamster et de 35 % pour les fibroblastes de Rat (Tableau 2.III).

b) Clonage sans couche nourricière, en milieu enrichi de sérum embryonnaire de veau

Le clonage a donné d'excellents résultats avec les fibroblastes de Rat. Sa réalisation est très simple. Trois cents cellules d'une culture secondaire (P_1) de fibroblastes de Rat de 24 heures sont ensemencées dans du milieu Dulbecco enrichi de 20 % de sérum embryonnaire de veau et incubées pendant 12 jours dans une étuve à gaz carbonique à 10 %. L'efficacité de clonage atteint 27,9 % (tableau 2.III). Mais ces conditions sont insuffisantes pour permettre un bon clonage des cellules de Hamster : l'efficacité de clonage est de 3,7 % seulement ; aussi la technique a dû être abandonnée dans le cas des fibroblastes de Hamster.

c) Clonage sans couche nourricière, en milieu additionné de milieu conditionné

Cette méthode est inspirée de KOURI et LUBET (1971). La moitié du milieu employé pour l'ensemencement des cellules à cloner est du milieu frais, le complément est constitué par du milieu conditionné par la croissance de cellules qui s'y sont préalablement multipliées.

Dans la pratique, pour obtenir du milieu conditionné en grande quantité, il faut procéder à une mise en culture normale soit de fibroblastes de Rat en milieu Dulbecco + 20 % de sérum de veau normal, soit de fibroblastes de Hamster en milieu Dulbecco + 20 % de sérum embryonnaire de veau, selon la nature des cellules à cloner. Le milieu est retiré au moment de l'emploi, le plus tard possible, le 5ème jour après la mise en culture, lorsque les cellules se sont bien développées. Il est centrifugé stérilement (1000 t/mn, pendant 15 mn) afin d'éliminer toute cellule susceptible de s'y trouver en suspension.

Les cellules à cloner sont ensemencées dans 3 ml de milieu normal. Trois heures plus tard, dès que les cellules adhèrent, un volume égal de milieu conditionné est ajouté. L'efficacité de clonage obtenue avec les fibroblastes de Rat est satisfaisante (28,7 %), tandis qu'elle est plutôt médiocre dans le cas des fibroblastes de Hamster (6,3 %). Cette technique a dû être abandonnée.

d) Technique de fixation et de coloration des colonies en vue de l'examen histologique

Dans tous les cas, les colonies sont directement fixées et colorées dans les boites de Pétri. Après avoir retiré le milieu et après avoir rincé les cellules au PBS, on les laisse au contact de l'alcool méthylique pendant 5 minutes. Ensuite, les cellules sont colorées au May-Grünwald (produit RAL, Prolabo) pendant 10 minutes, puis au Giemsa (RAL, Prolabo) à 10 % dans l'eau, pendant une vingtaine de minutes. Les boites sont alors rincées à l'eau courante et séchées.

IV - RESULTATS

Comme il a été dit précédemment, la transformation cellulaire est caractérisée par des modifications morphologiques des colonies et des cellules les constituant, ainsi que par une amélioration de l'efficacité de clonage. Nous traiterons dans le même ordre la morphologie des colonies formées par des cellules normales ou transformées puis leur efficacité de clonage.

1°/ MORPHOLOGIE DES COLONIES OBTENUES A PARTIR DE :

- Cellules normales

Les colonies obtenues à partir de cellules non traitées se reconnaissent à certains caractères morphologiques. De forme circulaire et de contours bien délimités, leur diamètre varie de 1 à 12 mm. Cette variation dépend du milieu et de la technique utilisés. Le diamètre le plus courant est de 4 millimètres. Les cellules périphériques sont disposées en une couche monocellulaire, par contre au centre elles peuvent s'empiler tout en restant régulièrement rangées les unes à côté des autres.

L'aspect d'une colonie dépend de la morphologie des cellules qui la compose. Trois types cellulaires sont nettement distingués. Le plus souvent un seul type constitue la colonie, mais parfois les trois y sont présents. Ce polymorphisme peut s'expliquer par le fait qu'une même colonie dérive de deux ou trois cellules morphologiquement différentes.

Les cellules fibroblastiques, de type fusiforme, sont les plus fréquemment rencontrées. Ces cellules allongées en forme de fuseau, possèdent un gros noyau arrondi à plusieurs nucléoles et un cytoplasme abondant montrant des vacuoles. Ces fibroblastes sont rangés en faisceaux contigus parallèles ou en tourbillons et confèrent à la colonie un *"aspect dense"* (fig. 2.2B). Dans certains cas, elle est clair-semée ou *"semi-dispersée"* correspondant soit à une phase évolutive du type précédent (fig. 2.3 A), soit aux caractères morphophysiologiques des cellules.

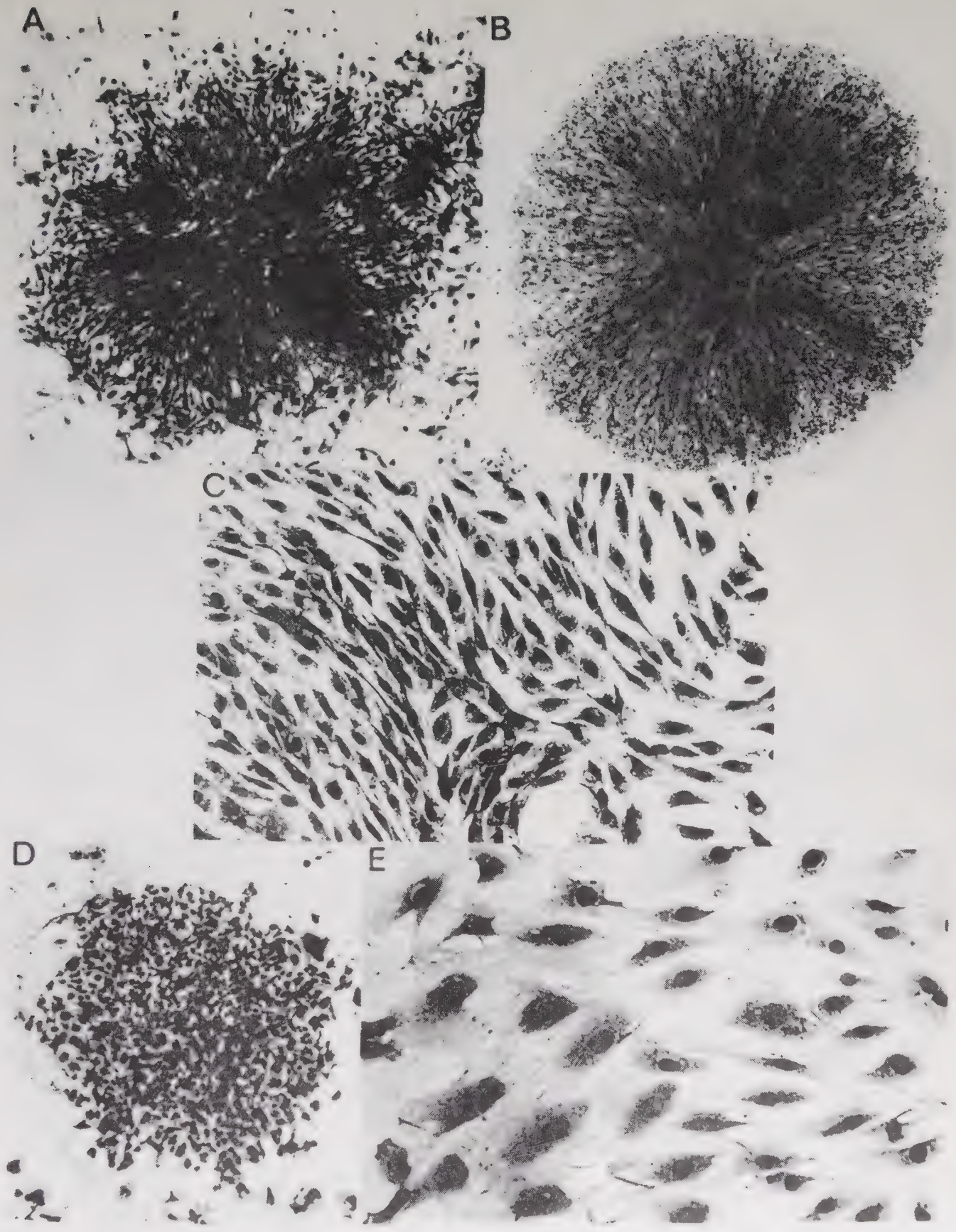


Figure 2.2 : COLONIES DE CELLULES NORMALES

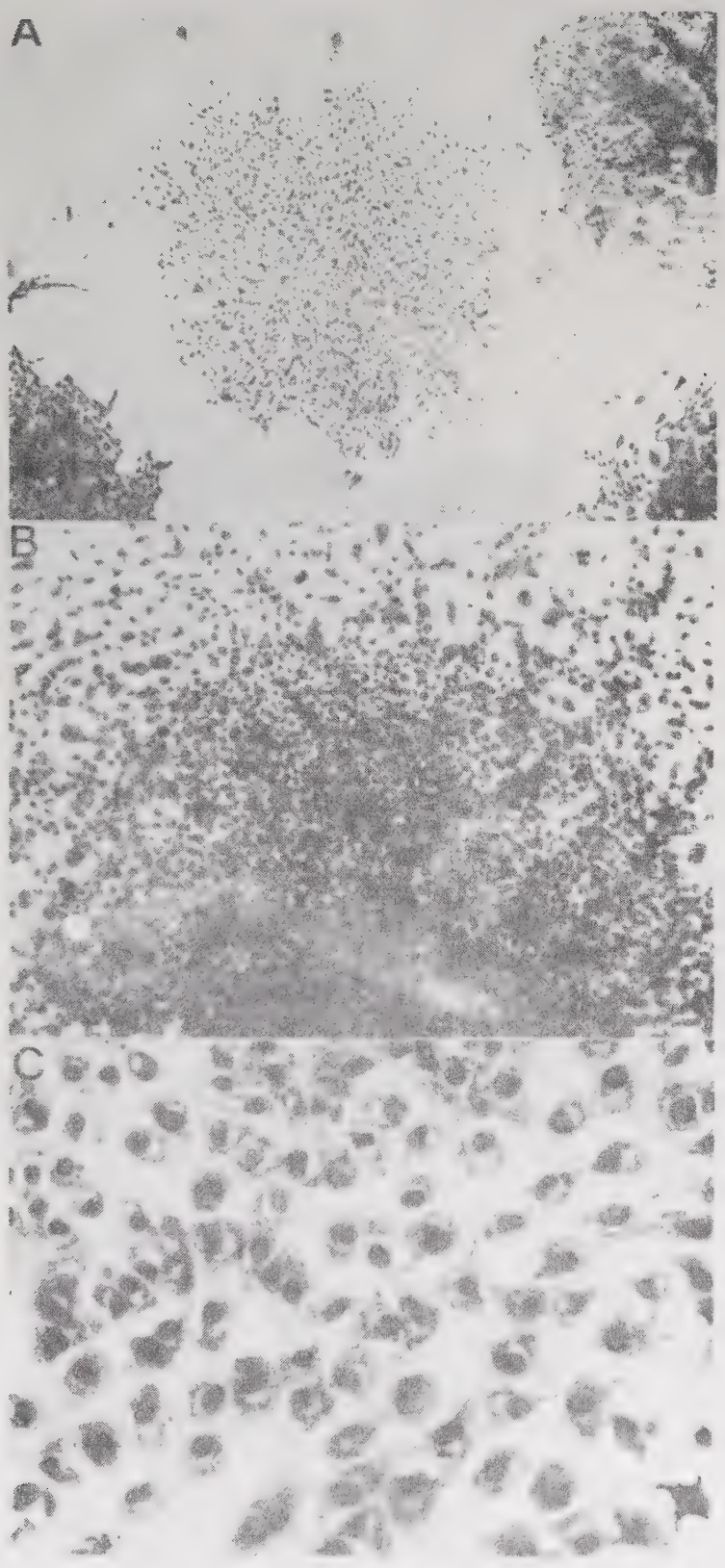
A - Fibroblastes hamster (X 80)

B - Fibroblastes rat (X 10)

C - Fibroblastes hamster (X 250)

D - Cellules hamster type voile (X 80)

E - Cellules hamster type voile (X 300)



A - Colonie semi-dispersée de type sarcomatoïde (X 30)

B - Colonie dense de type épithélioïde (X 80)

C - Colonie de type épithélioïde (X 300)

Figure 2.3 : Colonies de cellules normales

L'emploi de milieu pré-incubé modifie la morphologie des colonies. Leur organisation est beaucoup plus régulière et leur surface agrandie (fig. 2.2 C).

Des cellules fibroblastiques à cytoplasme type "voile" (fig. 2.2 D, E) consituent des colonies plus petites que les premières. En effet, lorsque les colonies sont formées d'un petit nombre de cellules, ces dernières s'étalent et ne prennent pas l'aspect typique de fibroblastes. Le cytoplasme étalé, très abondant, prend la forme d'un voile plissé. Les cellules disposées en une couche unique et plus ou moins jointives confèrent à la colonie un aspect semi-dispersé (fig. 2.2 E).

Tous les intermédiaires existent entre les fibroblastes de type fusiforme et les fibroblastes du type voile, d'où la difficulté à classer certaines colonies dans un groupe ou l'autre. De même la classification entre colonie dense et colonie semi-dispersée n'est pas toujours évidente, les cellules étant plus ou moins jointives.

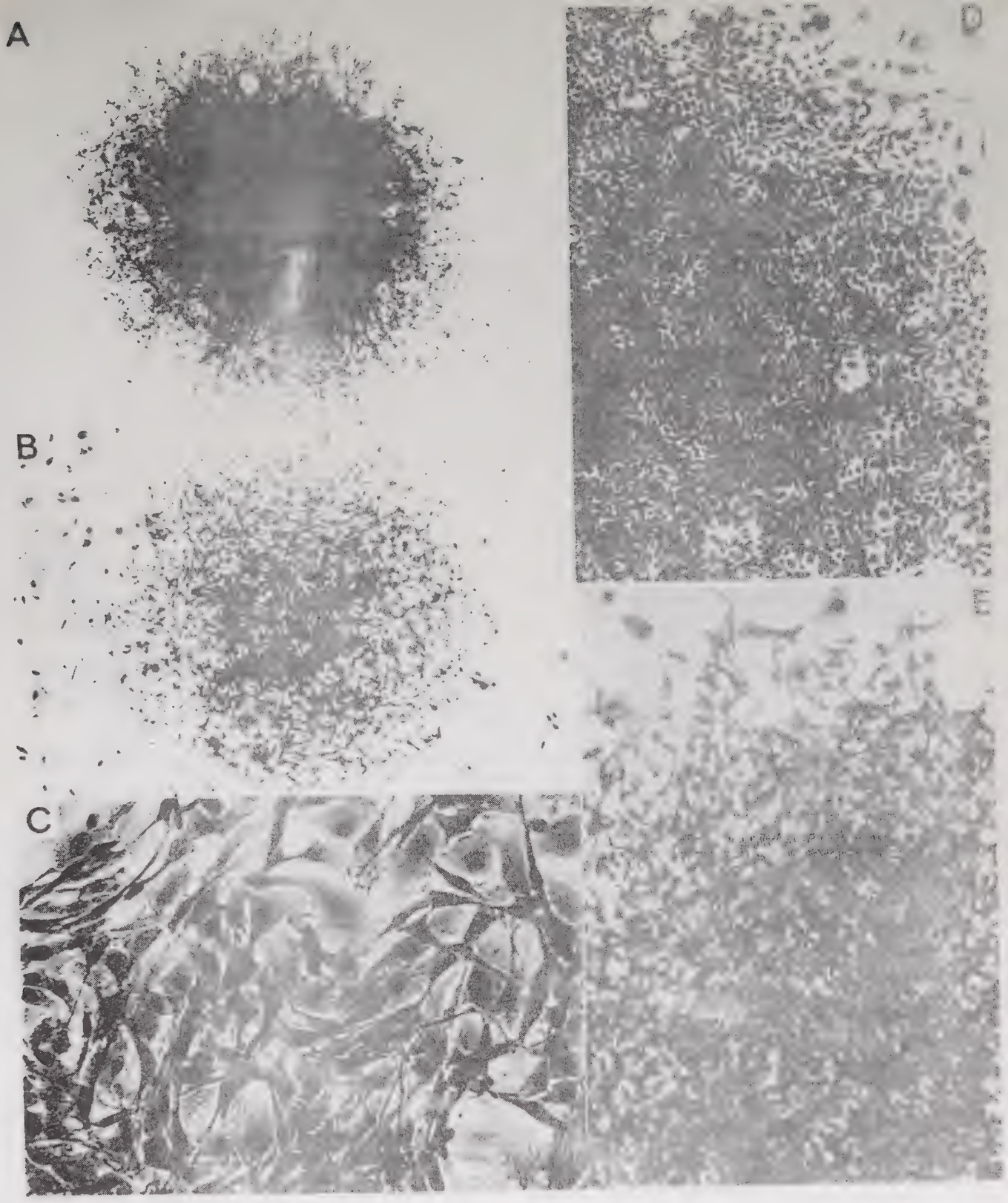
Enfin, un petit nombre de colonies sont formées *de cellules de type épithélioïde* (fig. 2.3 B, C). De contours polygonaux, elles sont intimement accolées entre elles. Le noyau, foncé, est très volumineux par rapport au volume cytoplasmique. Les colonies ainsi formées sont le plus souvent de type dense.

En résumé, des critères morphologiques permettent de classer les colonies normales en trois groupes. Cependant, compte tenu des variations du nombre des cellules et de leur agencement, cette classification n'est pas aussi nette qu'on le souhaiterait.

- Cellules transformées par le B(a)P

Les cellules transformées par le B(a)P confèrent aux colonies une morphologie différente de celle des colonies normales. On parle de colonies transformées. L'aspect général de la colonie n'est pas modifié et les types cellulaires précédement décrits se retrouvent. Toutefois, les cellules prennent une organisation, *une orientation différente* (fig. 2.4 A). En effet, elles se disposent au hasard, de façon anarchique, sur plusieurs couches, s'entrecroisant et s'enchevêtrant les unes dans les autres. Que les fibroblastes soient allongés ou de forme épithélioïde, la colonie prend un aspect touffu. En général, les colonies sont de type dense (fig. 2.4, B, D).

Cette organisation caractéristique d'une colonie transformée peut également être accompagée d'une modification de la *forme des cellules* (fig. 2.4 C). Elles prennent alors une forme étoilée avec des prolongements cytoplasmiques très longs et dans toutes les directions. Le noyau est très réduit. Ces colonies sont en général de type semi-dispersé (fig. 2.4, C, E).



igure 2.4 : COLONIES DE FIBROBLASTES DE HAMSTER TRANSFORMES PAR LE BaP

A - Colonie dense (X 30)

B - Colonie semi-dispersée (X30)

C - Fibroblastes transformés (X 300)

D - Colonie dense (X 80)

E - Colonie semi-dispersée (X 80)

Dans certains cas, les cellules périphériques seules prennent un aspect désorganisé caractéristique d'une transformation. Ce fait est probablement dû à la transformation tardive, au cours des dernières mitoses cellulaires de la colonie. Cette dernière est finalement constituée de cellules *normales* et de *cellules transformées*. Dans ces conditions, il est difficile d'opter pour une colonie transformée.

En conclusion, la distinction entre colonies transformées et colonies normales est souvent malaisée. Employés seuls, les critères morphologiques paraissent donc trop peu précis pour déterminer dans tous les cas et avec certitude qu'une cellule n'est pas transformée, qu'elle est en cours de transformation ou qu'elle a été transformée. Pour pallier à cet inconvénient, une autre technique a été développée. Elle sera décrite plus loin.

2°/ EFFICACITE DE CLONAGE ET EFFICACITE DE TRANSFORMATION OBSERVEES

Comme nous l'avons déjà définie l'efficacité de clonage est le nombre de colonies par rapport au nombre de cellules ensemencées, tandis que l'efficacité de transformation est le nombre de colonies transformées par rapport au nombre total des colonies. Dans les deux cas, les résultats sont exprimés en nombre absolu ou en pourcentage. Dans le cas des cellules normales l'efficacité de clonage seule est à considérer. Par contre, lorsque les cellules sont traitées

par le B(a)P, il faut tenir compte de l'efficacité de clonage qui montre un effet toxique et de l'efficacité de transformation.

- Efficacité de clonage des cellules normales

Le nombre de colonies formées est fonction du nombre de cellules ensemencées. Le tableau 2.IV résume les résultats obtenus avec des fibroblastes embryonnaires de Hamster et de Rat.

Tableau 2.IV : Nombre de colonies formées et efficacité de clonage (%) en fonction du nombre de cellules de Rat et de Hamster ensemencées par boite.

Nombre de cellules ensemencées		50	100	200	400	600
Hamster	Nombre de colonies par boite			17,8	37	44,6
	Efficacité de clonage %			8,9	9,2	7,4
Rat	Nombre de colonies par boite	9,5	17,3	28,4	43,9	67,7
	Efficacité de clonage %	19	17,3	14,2	11	11,3

Le nombre de colonies observées augmente avec le nombre de cellules ensemencées. Cependant, cette augmentation n'est pas linéaire et se traduit par une diminution correspondante de l'efficacité de clonage. Ce fait peut s'expliquer par la superposition ou *coïncidence de point* de deux ou plusieurs cellules au moment de leur adhérence au fond de la boite de Pétri. Cette *coïncidence de point* est proportionnelle au nombre de cellules ensemencées. La diminution de l'efficacité de clonage est moindre pour les fibroblastes de Hamster. Il faut remarquer toutefois que l'efficacité de clonage même pour ces cellules est plus faible. La physiologie des deux types cellulaires liée au milieu de culture est probablement la cause de cette différence.

Afin d'obtenir un nombre acceptable de colonies et de réduire l'effet de la *coïncidence de point* le nombre de cellules pour les expériences de clonage a été fixé à 300 cellules par boite. Avec ce nombre de cellules et dans les meilleures conditions, l'efficacité de clonage atteint 18,5 % pour les fibroblastes de Hamster et 35 % pour ceux de Rat (tableau 2.III).

Enfin, l'efficacité de clonage des cellules non traitées varie d'une expérience à l'autre. De nombreux auteurs l'ont déjà signalé (MEDINA et coll., 1963 ; BERWALD et coll., 1965). La cause doit en être imputée aux variations de viabilité des cellules, aux variations des différents sérums utilisés et aux variations des irradiations de la couche nourricière. Il est donc capital d'avoir un groupe témoin lors de chaque expérience.

- Efficacité de clonage (toxicité) et efficacité de transformation des cellules traitées

Les cellules embryonnaires de Rat et de Hamster sont soumises à l'action du B(a)P au cours du clonage ou pendant le passage précédent le clonage.

Dans le 1er cas, des cellules d'une culture secondaire (P_1) de 2 jours sont ensemencées en petit nombre sur couche nourricière, d'après la technique de clonage précédemment décrite. Le B(a)P est ajouté dans le milieu 24 heures après. Il n'est retiré que 8 jours plus tard au moment de la fixation et de la coloration des colonies.

Dans le 2ème cas, des cellules en nappe d'une culture secondaire sont traitées pendant 3 et 6 jours ; la culture est ensuite maintenue en absence de B(a)P dans du milieu frais jusqu'au 14ème jour, date du repiquage de clonage. Huit jours après les colonies sont fixées et colorées.

Les tableaux 2.V et 2.VI présentent les résultats obtenus avec des fibroblastes de Hamster en fonction des différents paramètres.

- *L'efficacité de clonage des cellules traitées diminue lorsque la dose augmente*. Par contre, *l'effet toxique du B(a)P augmente avec la dose*. Néanmoins, pour la dose 40 µg l'efficacité de clonage remonte et la toxicité diminue.

- *L'efficacité de transformation augmente avec la dose*, mais cette augmentation n'est pas très évidente entre les groupes de cellules traitées au cours du clonage. Cepen-

Tableau 2.V : Efficacité de clonage et transformation des fibroblastes embryonnaires de Hamster traités au cours du clonage sur couche nourricière.

(Durée du traitement : 8 jours, 300 cellules/boite)

B(a)P µg/ml	Nombre boites	Nombre colonies	Efficacité clonage %	Toxicité %	Nombre colonies transformées	% colonies transformé
Solvant	10	556	18,5	0	5	0,9
0,1	10	493	16,4	11,4	21	4,3
1	10	438	14,6	21,1	18	4,1
10	9	339	12,4	33	15	4,4
40	9	392	14,5	21,6	23	5,9

Tableau 2.VI : Efficacité de clonage et transformation de fibroblastes embryonnaires de Hamster traités avant le repiquage de clonage (clonage sur couche nourricière, 5 boites ensemencées, 300 cellules/boite).

Durée du traitement	Dose B(a)P µg/ml	Nombre total colonies	Efficacité clonage %	Toxicité %	Nombre de colonies transformées
--	0	88	5,9	0	1/88
3 jours	0,1	73	4,9	17	1/73
	1	22	1,5	75	3/22
	10	16	1,1	81	1/16
6 jours	0,1	94	6,3	0	4/94
	1	21	1,4	76	0
	10	16	1,1	81	0

dant, l'efficacité de transformation tout en étant faible, par rapport aux témoins, est significativement élevée (χ^2 = 18.62, ddl : 4 ; P = 0,1). Plusieurs faits sont à noter.

Tout d'abord, comme HUBERMAN et coll. (1966), DI PAOLO et coll. (1969a) l'ont constaté, l'effet toxique du B(a)P se manifeste par une diminution de l'efficacité de clonage. De plus, la transformation est un phénomène rare, distinct de la toxicité. En effet, HUBERMAN et coll. (1966) constatent que la toxicité augmente pour atteindre un plateau alors que la transformation continue à augmenter. Dans le tableau 2.V, une diminution de la toxicité pour la dose 40 µg est observée, alors que l'efficacité de transformation augmente. La diminution de la toxicité est d'ailleurs parallèle à une remontée de l'efficacité de clonage, qui de toute évidence est due à l'action transformante du B(a)P. BERWALD et SACHS (1965), GELBOIN et coll. (1969) ont signalé que la transformation cellulaire *in vitro* peut se mesurer par la capacité des cellules à former des colonies. Effectivement, dans le groupe de cellules traitées avec 40 µg/ml, le pourcentage de colonies transformées est également plus élevé que dans le groupe traité par 10 µg/ml. La même observation est constatée avec les fibroblastes de Rat, dès la concentration de 10 µg/ml.

Le tableau 2.VI montre l'influence de la durée du traitement. Le nombre peu élevé de colonies ne permet pas de donner une valeur statistique à ces résultats. Néanmoins,

certains faits ont été retenus, d'autant plus qu'ils ont été reproduits dans les mêmes conditions expérimentales. A dose faible, *l'efficacité de clonage et l'efficacité de transformation augmentent avec la durée du traitement* ; à doses plus élevées, *l'efficacité de clonage, plus faible, semble indépendante de la durée du traitement, l'efficacité de transformation est inhibée par l'effet toxique du B(a)P.* En effet, les cellules se sont gorgées de B(a)P qui continue d'agir alors que le milieu ne contient plus cette substance. Le traitement de 3 jours ne produit pas cet effet toxique (tableau 2.VI).

En conclusion, l'ensemble de nos résultats confirme ceux qu'ont obtenus de nombreux auteurs cités au début de ce chapitre : *le clonage cellulaire, toujours possible n'est pas de réalisation aisée ; - le B(a)P a un effet toxique sur les cellules en diminuant l'efficacité de clonage ; - la transformation cellulaire est un évènement relativement rare.*

Ces constatations imposent quelques remarques :

- Le faible pourcentage de colonies transformées exige un nombre considérable de colonies, donc de boites de Pétri, pour que les résultats puissent être interprêtés statistiquement.

- Les variations de l'efficacité de clonage d'une expérience à l'autre exigent des témoins négatifs, et pour plus de sécurité des témoins positifs.

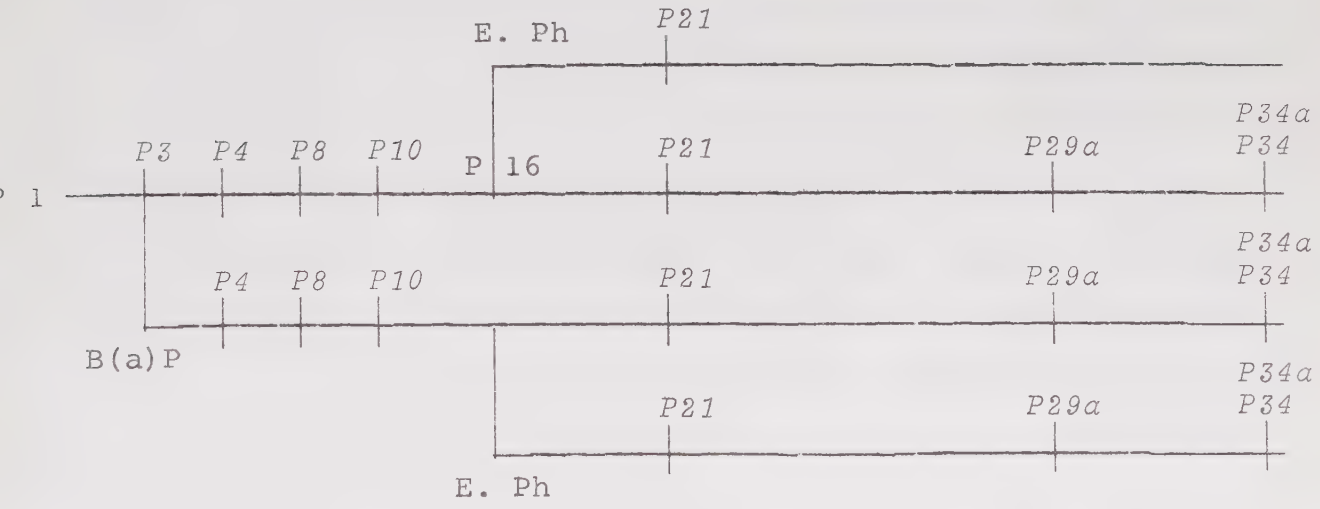
- Enfin, la preuve indubitable de la transformation est la formation de tumeurs après réimplantation des cellules transformées sur animal isologue. Cette dernière preuve n'a jamais pu être réalisée directement à partir de colonies traitées à court terme. Les expériences concluantes ont été faites avec des sous-cultures de colonies transformées de façon à obtenir un nombre suffisant de cellules injectables sur animal (DI PAOLO et coll., 1969b) ou avec des cellules traitées en masse et entretenues pendant plusieurs lignées (BERWALD et coll., 1965). De toute façon, les échecs de réimplantation ne signifient pas une absence de transformation ; il est connu en effet que les cellules transformées par des agents chimiques *in vitro* et *in vivo* possèdent des antigènes spécifiques (KLEIN, 1968 ; PREHN, 1968 ; EMBLETON et HEIDELBERGER, 1972 ; CARRUTHERS et coll., 1972). Ces derniers ont d'ailleurs utilisé cette propriété comme critère de transformation.

Pour ces diverses raisons et sans attendre de preuve supplémentaire, nous avons essayé de confirmer notre hypothèse de la transformation en deux phases, initiation et promotion, en culture de tissus sur des fibroblastes cultivés à long terme, au lieu de le faire in vivo sur des cellules épithéliales de la peau de Souris.

3°/ *TRANSFORMATION EN DEUX PHASES DES FIBROBLASTES DE RAT*

Il nous a semblé que l'étude du mode d'action des hydrocarbures et des phénomènes intimes de la cancérisation serait facilitée si l'hypothèse de la cocancérogenèse ou cancérisation en deux phases déjà discutée au premier chapitre, pouvait être vérifiée *in vitro*. C'est dans ce but que, nous inspirant des travaux cités *in vivo* et *in vitro*, nous avons entrepris l'expérience qui suit (fig. 2.5).

Figure 2.5 : Plan de l'expérience de transformation en deux phases (initiation et promotion) des fibroblasres de rat WAF



Passages : "P... "

Contrôle de l'efficacité de clonage sur couche nourricière :

"P3, P4, P8, P10, P16, P21, P34"

Contrôle de l'efficacité de clonage sur agarose :

"P29a, P34a"

Il s'agit d'initier des cellules en culture de tissus avec du B(a)P, comme *in vivo* ; puis de les soumettre à l'action de l'ester de phorbol, considéré comme le promoteur idéal et dont nous avons déjà parlé (page 22). Des fibroblastes embryonnaires de rat WAF (P3) sont traités avec 1 µg/ml de B(a)P, pendant 2 heures. Après retrait de la substance, la culture est entretenue en boites de Pétri par repiquages successifs des cellules tous les cinq jours. Une lignée témoin sans ester de phorbol, est observée parallèlement à la lignée traitée. A partir du passage (P16), la moitié des 2 groupes est soumise à l'action de l'ester de phorbol à la dose de 0,01 µg/ml d'une solution acétonique à 0,0004 %. Ce dernier est ajouté aux cellules à chaque changement de milieu, aussi sa présence est-elle constante dans la culture. La transformation est suivie, dès le début du traitement, par clonage sur couche nourricière et par clonage sur agarose. Mais au passage (P4), le polymorphisme des cellules ne permet pas une interprétation correcte. Il faut attendre le passage (P8) pour observer des fibroblastes morphologiquement homogènes.

Le tableau 2.VII compare la transformation des cellules des divers groupes. Les témoins *"ester de phorbol"* ont été perdus ; cette partie de l'expérience a dû être recommencée ; jusqu'à maintenant et sous toute réserve, aucune transformation n'est constatée. Dans les autres groupes, une augmentation progressive du pourcentage de colonies transformées apparaît. Plusieurs remarques sont à faire

Tableau 2. VII : EFFICACITE DE CLONAGE ET EFFICACITE DE TRANSFORMATION DES FIBROBLASTES DE RATS NORMAUX ET TRAITES AVEC LE BaP ET L'ESTER DE PHORBOL (clonage sur couche nourricière et sur agarose (a)).

Clonages au cours des passages (P)	Nombre de colonies	Efficacité de clonage	Nombre de colonies transformées	Efficacité de transformation %
P 8 - Contrôle	312	31,2	4	1,3
P 8 - BaP (x1)	397	39,7	10	2,5
P 10 - Contrôle	174	17,4	3	1,7
P 10 - BaP (x1)	258	25,8	6	2,3
P 21 - Contrôle	282	28,2	0	0
P 21 - BaP (x1)	288	28,8	7	2,4
P 21 - BaP (x1) + E.Ph (x6)	384	31,2	5	1,3
*P 29a** - Contrôle			0	
*P 29a** - BaP (x1)			+	
*P 29a** - BaP(x1) + E.Ph(x14)			++	
P 34 - Contrôle	219	21,9	3	1,4
P 34 - BaP (x1)	122	12,2	25	20,5
P 34 - BaP (x1) + E.Ph(x19)	123	12,3	41	33,0
*P 34a** - Contrôle			0	
*P 34a** - BaP (x1)			+	
*P 34a** - BaP(x1) + E.Ph(x19)			+++	

* - Les efficacités de transformation en clonage sur agarose ont évaluées :

- 0 : 0 colonie
- + : Colonies rares (de 3-4 cellules chacune)
- ++ : Colonies peu fréquentes (de 3-4 cellules chacune)
- +++ : Colonies nombreuses (de 10-20 cellules chacune)

- au passage (P8) l'analyse des résultats est gênée par la trop grande variation de la morphologie des colonies,

- jusqu'au passage (P21), l'efficacité de clonage paraît plus élevée chez les cellules traitées par le B(a)P seul que chez les témoins, alors que le pourcentage de cellules transformées est constant et faible surtout chez les cellules initiées et traitées avec l'ester de phorbol.

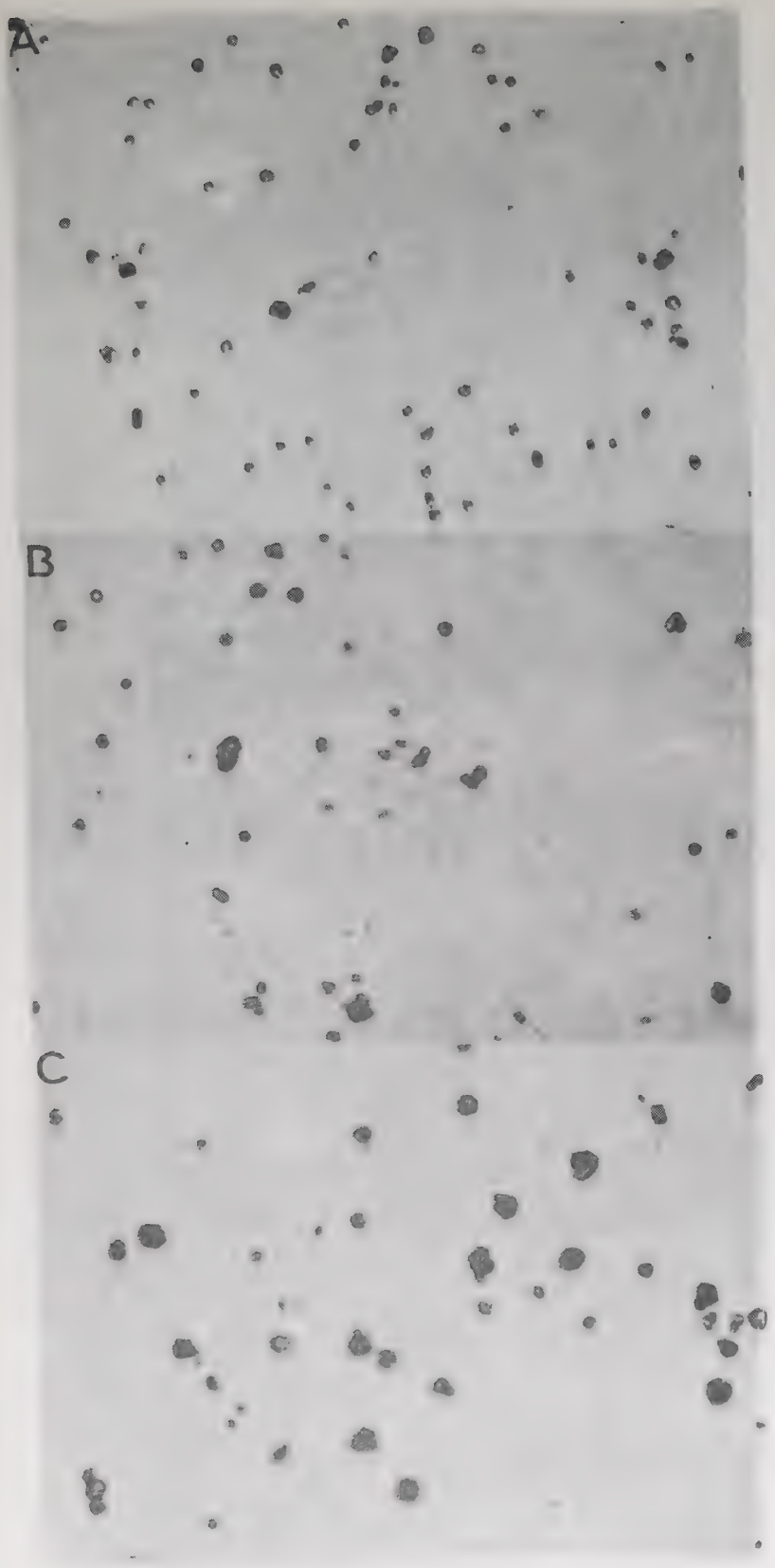
- dans ce dernier groupe, apparaît très rapidement une stimulation de la croissance des cellules en nappe, mise en évidence par une augmentation de l'efficacité de clonage qui est égale au passage (P21) à 31,2 % contre 28,2 % pour les témoins. Ce phénomène rappelle tout à fait l'hyperplasie épidermique après traitement par l'ester de phorbol. Puis, le pourcentage de transformation augmente lui aussi plus rapidement que dans les autres séries. Au passage (P34), il est de 33 % contre 20,5 % chez les cellules traitées au B(a)P seul (χ^2 = 5.308, ddl 1 ; P $\leqslant$ 5).

- clonés sur gel d'agarose, les cellules (P29) et (P34) se comportent tout à fait différemment selon le traitement, comme la figure 2.6 le montre. Les cellules témoins restent isolées, quelques rares cellules s'accolant deux par deux. Les cellules traitées par le B(a)P seul donnent des colonies tridimensionnelles très clairsemées, tandis que les cellules initiées puis traitées par l'ester de phorbol développent des colonies tridimensionnelles beaucoup plus prolifératives (10-20 cellules) et beaucoup plus nombreuses. Nous n'avons pas quantifié cette différence car elle est évidente (fig.

Après repiquage, en milieu normal, les colonies tridimensionnelles ont donné des sous-lignées de cellules purement tumorales, puisque la totalité des colonies formées sont transformées.

De plus, des cellules (2 millions par animal) des différents groupes sont injectées à des rats nouveau-nés âgés de 2 jours, par voie sous cutanée au niveau du crâne, zône très vascularisée. Au bout de 3 mois, les animaux ayant reçu une injection de cellules témoins n'ont pas développé de tumeurs. Trente cinq jours après la greffe, les cellules initiées par le B(a)P seul ont donné une tumeur sur dix animaux inoculés. Par contre les cellules initiées et traitées par l'ester de phorbol ont entraîné le développement de tumeurs chez les dix animaux inoculés. De plus la première tumeur est apparue quinze jours après l'injection sous-cutanée. L'examen histologique de ces tumeurs prouve qu'il s'agit de sarcomesde type chimique. L'aspect typique des cellules sarcomateuses apparaît sur la figure 2.8. Tassées les unes contre les autres, groupées en faisceaux elles sont du type fibroblastique. Les noyaux très foncés, gros et ovalaires, possèdent des grains de chromatine sphériques. A certains endroits on note des atypies nucléaires. Ces tumeurs sont transplantables.

En conclusion, cette expérience vérifie *in vitro* et sur des fibroblastes, l'hypothèse de la transformation cellulaire par des agents chimiques, en deux phases : initiation et promotion ; le B(a)P étant l'initiateur, l'ester



A - Cellules témoins

B - Cellules + B(a)P

C - Cellules + B(a)P +
Ester de Phorbol

Figure 2.6 : Clonage sur gel d'agarose de cellules de rat WAF, traitées par le B(a)P et l'Ester de Phorbol. (x 10)

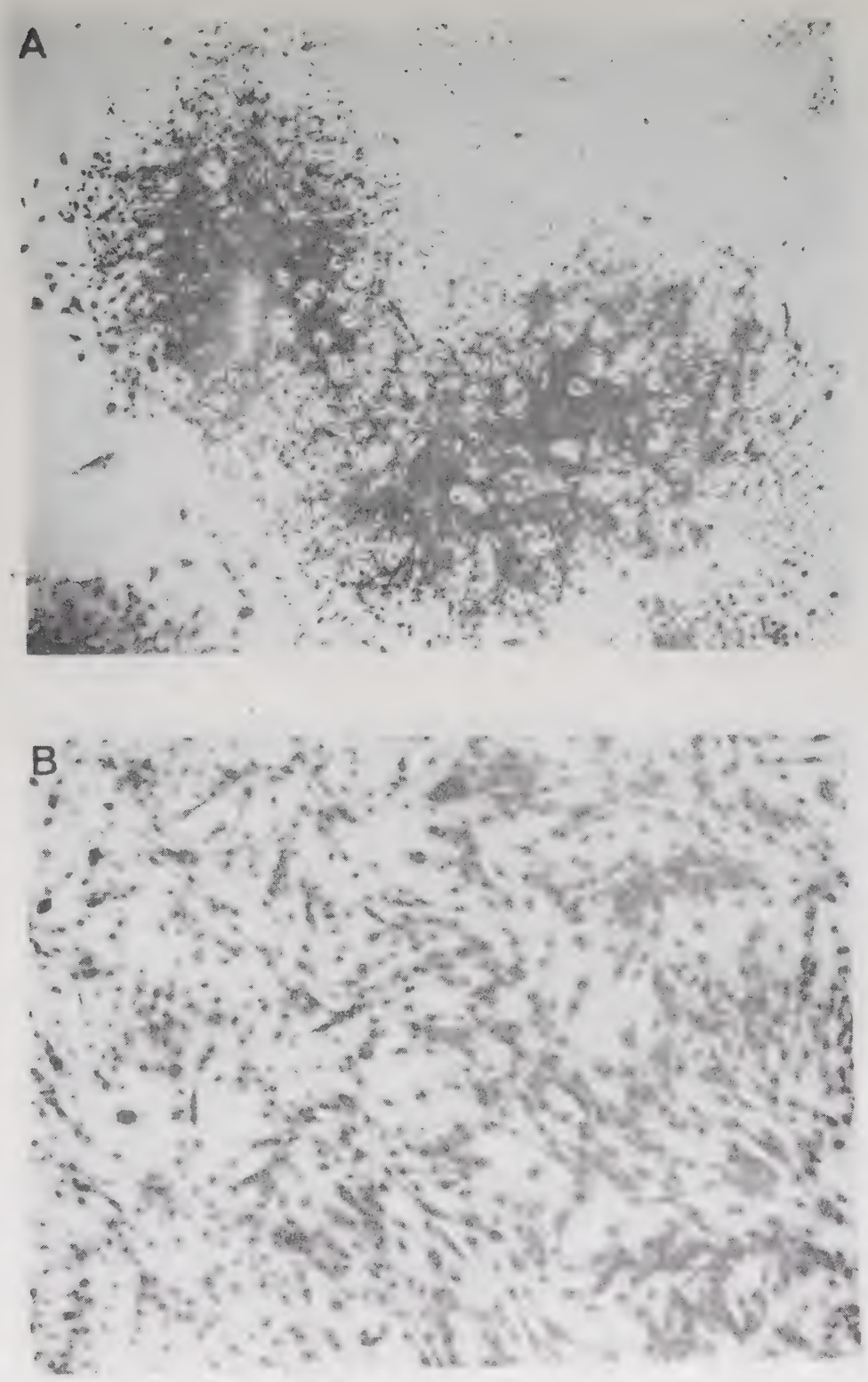


Figure 2.7 : Cellules provenant du repiquage de colonies tridimensionnelles
A - Colonies transformées
B - Nappe de cellules transformées

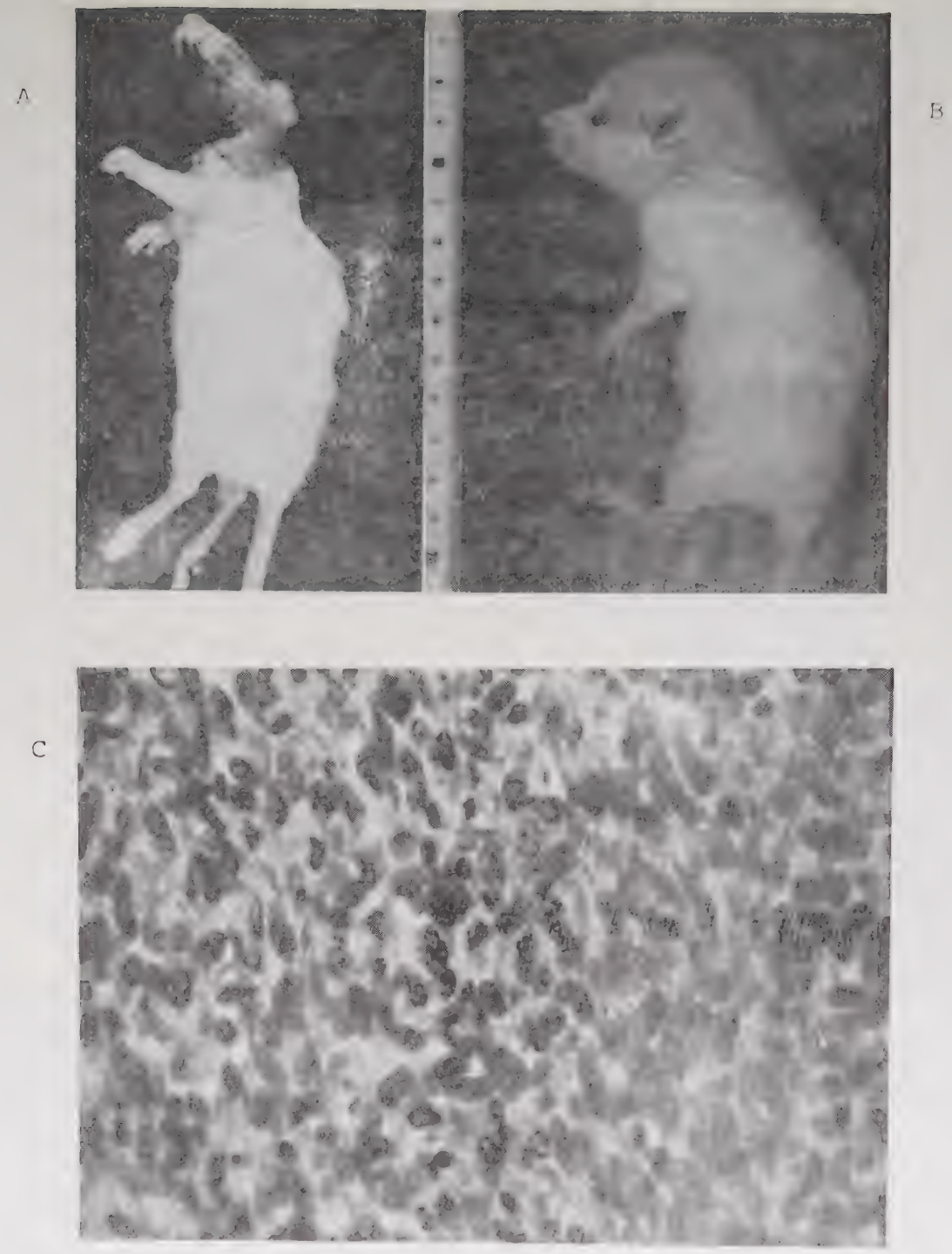


Figure 2.8 : Sarcome chimique obtenu chez des rats nouveau-nés par injection sous cutanée de cellules traitées par le B(a)P et l'ester de phorbol
A - rat âgé de 15 jours
B - rat âgé de 1 mois
C - histologie (x 400).

de phorbol le promoteur. Aussi, pour les études de cancérogenèse chimique l'animal peut-il être remplacé par des cultures de tissus et les cellules épidermiques par des fibroblastes.

4°/ *DISCUSSION ET CONCLUSION*

Nos résultats, discutés d'ailleurs au cours de l'exposé, confirment l'effet toxique du B(a)P en culture de tissus de même que son action transformante sur les fibroblastes. Cependant, la toxicité (exprimée par une diminution de l'efficacité de clonage) et la transformation cellulaire (qui normalement augmente cette efficacité de clonage) par suite d'un phénomène de superposition, peuvent entraîner des résultats contradictoires. Ceux-ci sont en rapport avec la dose de la substance, la durée du traitement et le moment du contrôle de l'efficacité de clonage. Sur ce sujet, aucune étude complète n'existe. Pour diverses raisons, nos travaux (tableaux 2.VIet 2.VII) sont également incomplets, mais la valeur des résultats n'est pas diminuée pour autant.

L'interprétation des colonies transformées est un point important. Nous avons déjà souligné qu'elle était délicate et rendue plus difficile par les divers types de populations cellulaires provenant des cultures primaires d'embryons entiers. La lecture est particulièrement incommode avec les cellules de Rat. Dans le tableau 2.VII, des colonies

transformées sont trouvées chez les témoins, depuis le début de la culture jusqu'au P10. De plus, la transformation peut se manifester au cours du développement de la colonie, de sorte que sa population cellulaire est mixte. Il est alors difficile de conclure à une transformation morphologique.

Par contre, le clonage sur agarose montre d'emblée les cellules transformées, car celles qui sont normales ne développent pas de colonies tridimensionnelles. Pour cette raison les résultats donnés par cette méthode sont plus faciles à lire et plus significatifs. Enfin, ils sont confirmés par l'obtention de tumeurs sur animal après inoculation de cellules transformées.

A notre connaissance, la cocancérogenèse n'a jamais été étudiée *in vitro*, ou toutefois, rien n'a été publié et nos résultats ne peuvent être discutés que dans le cadre des études *in vivo*. Cette discussion est même très limitée, puisque le schéma expérimental reproduit le schéma établi *in vivo*. Les résultats obtenus avec les cellules traitées par l'ester de phorbol après initiation au B(a)P, à savoir, l'augmentation de l'efficacité de clonage sur couche nourricière, la formation de colonies sur agarose, l'obtention des tumeurs sur animal démontrent la transformation cellulaire par des agents chimiques en deux phases et en culture de tissus. L'absence de témoins *"ester de phorbol"* seul diminue la portée de nos résultats, mais jusqu'à maintenant, dans notre expérience en cours, rien ne laisse supposer un effet propre de l'ester de

phorbol. Jusqu'à preuve du contraire, nous le considérons moins actif que le B(a)P seul, si ce n'est inactif.

Enfin, la transformation cellulaire pourrait être due à un virus oncogène, induit ou de contamination. Des examens au microscope électronique sont en cours. Toutefois, il semble que les virus oncogènes soient inconnus chez le Rat (SACHS et coll., 1962 ; SANFORD, 1967).

En conclusion, la méthode de culture de tissus permet :

- une étude quantitative de l'effet toxique des agents chimiques,
- d'apprécier l'action cancérogène de ces agents,
- d'étudier les mécanismes de la transformation.

TROISIEME CHAPITRE

FIXATION DU BENZO(a)PYRENE PAR LES CELLULES IN VITRO

I - INTRODUCTION

Il ressort des chapitres précédents que les effets biologiques du B(a)P sont très considérables, que ce soit *in vivo* au niveau de tous les organes ou *in vitro*. Ils nous font pressentir l'importance de cet hydrocarbure et l'intérêt des recherches sur son activité. Cependant, les essais quantitatifs *in vivo* ont une signification limitée. En effet, lorsqu'on administre du B(a)P à l'organisme de quelque façon que ce soit, il est aussitôt transformé, véhiculé, en partie inutilisé et éliminé. De fait, après une application cutanée, le B(a)P se retrouve dès les premières heures partout dans l'organisme et au bout de 48 heures, on n'en trouve presque plus au niveau de l'épiderme. Néanmoins, il n'est pas sans intérêt de connaître quelle fraction de B(a)P est inductrice de tumeurs : la quantité de B(a)P réellement fixée par les cellules épidermiques, la quantité qui les *"traverse"* à l'état naturel, ou la quantité de B(a)P métabolisé par ces cellules. Ces problèmes peuvent être

abordés et étudiés avec la méthode et le modèle expérimental que nous venons de décrire en culture de tissus. Mais avant tout, une étude quantitative de la fixation du B(a)P par les cellules est indispensable. Un bref rappel historique des travaux antécédents démontrera les lacunes des techniques utilisées.

Les études de pénétration, de localisation ou de fixation du B(a)P sont faites surtout *in vivo* et par les méthodes de fluorescence, d'autohistoradiographie ou de scintillation. La première est basée sur le spectre de fluorescence spécifique du B(a)P, les deux dernières utilisent les hydrocarbures marqués (corps radioactifs).

A l'aide de la fluorescence par l'observation directe en lumière ultraviolette (BECK et PEACOCK, 1940) ou par examen au microscope, en lumière ultra-violette (GRAFFI, 1942 ; HAMPERL et coll., 1943 ; NORDEN, 1953, 1957 b ; BOCK, 1964), il a été démontré que le B(a)P après badigeonnage cutané se localise tout d'abord au niveau de la kératine, des follicules pileux et des glandes sébacées ; ensuite dans les couches profondes de l'épiderme puis dans le derme. La même technique de fluorescence est utilisée pour des observations au niveau de l'estomac (SETALA et coll., 1950 ; ERMELA et coll., 1951) et du poumon (DONIACH et coll., 1943 ; CASU, et coll., 1951).

Une plus grande précision topographique au niveau de la peau est obtenue par autohistoradiographie par BUSCHER et coll. (1968) et SOBIN (1970), qui confirment la localisation du B(a)P dans l'épiderme, les follicules pileux et les glandes sébacées. De plus, l'élimination du B(a)P se fait par le sébum (SOBIN, 1970) ou par la kératine (OEHLERT et coll., 1966). Ces derniers en associant l'autohistoradiographie à des techniques d'extraction constatent une fixation du B(a)P sur l'ARN, l'ADN et les protéines des cellules épidermiques.

Ces résultats très intéressants, obtenus par la fluorescence ou l'autohistoradiographie ne donnent aucune précision sur l'aspect quantitatif ou sur le mode de fixation du B(a)P au niveau des tissus. La disparition de la fluorescence peut exprimer soit l'élimination, soit la transformation de la substance. HARVEY et coll. (1963) constatent, par fluorescence, que le B(a)P persiste dans le poumon 8 à 14 jours. SAFFIOTTI et coll. (1963, 1968, 1972) trouvent que la totalité du B(a)P disparaît du poumon en une semaine, tandis que DONTENWILL et coll. (1968) notent la disparition du B(a)P dans le poumon au bout de deux jours et dans le reste de l'organisme au bout de 5 jours. Dans l'étude du métabolisme du B(a)P, CHALMERS et coll. (1936) constatent après injection intraveineuse que le B(a)P est éliminé, transformé par les fèces et les urines. DONIACH et coll. (1943) retrouvent des métabolites dans tous les organes. CALCUTT et coll. (1953, 1954) par contre n'en trouvent pas au niveau du

foie, bien que le métabolisme des hydrocarbures s'effectue surtout dans cet organe (SIMS, 1967 ; SCHLEDE et coll., 1970 ; GENTIL et coll., 1971).

Ces contradictions montrent que les méthodes ne sont pas élaborées et les résultats imprécis. La fluorescence peut seulement détecter une quantité de B(a)P égale à 0,1 µg, du fait de la fluorescence non spécifique des constituants cellulaires (BOCK, 1964 ; BOYLAND et GREEN, 1962 ; SHIRES, 1969).

La méthode de scintillation est la mieux adaptée aux études quantitatives. Ainsi, HEIDELBERGER et coll., (1951) ont étudié la répartition quantitative du B(a)P dans les divers organes après injection sous-cutanée ou badigeonnage, ainsi que ses voies d'élimination. Des études similaires ont été effectuées par KOTIN et coll., (1959) et DELWAIDE (1969). Toutefois, il faut souligner que ce sont des études plutôt physiologiques concernant l'animal. Elles ne fournissent aucune information sur le mode de fixation du B(a)P ou d'un autre hydrocarbure par une cellule isolée, pas plus que sur son devenir dans cette cellule , enfin elles ne donnent pas de résultat net sur le mécanisme de la transformation cellulaire. Cependant du fait de la grande précision quantitative de la scintillation, nous l'avons utilisée dans notre modèle expérimental.

Ce troisième chapitre présente la description de notre méthode d'étude de la fixation du B(a)P et les résultats observés.

II - MATERIEL ET METHODES

Le principe de la méthode est de mettre en contact des cellules en suspension avec du B(a)P radioactif dans des conditions rigoureusement contrôlées ; puis de mesurer, d'une part la radioactivité du milieu, d'autre part la radioactivité des cellules après leur séparation par centrifugation.

1°/ LES CELLULES

Des cellules tumorales et des cellules normales sont employées.

Le plus souvent et pour toutes les expériences de mise au point méthodologique nous avons fait appel aux cellules *tumorales ascitiques de la tumeur BP8*. C'est un fibrosarcome, induit par le B(a)P (GORER, 1957) sur des souris C_3H et entretenu sous sa forme ascitique. Le choix de ces cellules est déterminé par des raisons de commodité ; elles sont en grand nombre et bien isolées sans avoir à être traitées par la trypsine, le versène ou autre agent qui risquerait d'altérer la membrane cellulaire.

A titre de comparaison, nous avons également employé *la tumeur ascitique* LS_1IC, un lymphosarcome d'origine thymique apparu spontanément chez une souris IC ; cette tumeur est transplantée sous forme solide ou ascitique depuis une dizaine d'années dans notre laboratoire.

Les cellules du sarcome BP 8 et du lymphosarcome LS_1IC sont prélevées par aspiration à la pipette Pasteur,

préalablement trempée dans de l'héparine, le 6-7ème jour suivant leur inoculation sur animal. L'héparine évite la coagulation toujours possible du liquide ascitique. Ensuite, les cellules diluées dix fois dans du milieu 199 (Difco) préalablement réchauffé à 37°, sont alors centrifugées pendant 5 minutes à 800 t/mn (cette opération est appelée lavage). Les cellules sont alors resuspendues dans le même milieu à la concentration désirée. Le contrôle de la viabilité se fait en présence de trypan bleu.

Les *cellules normales*, de même type que les cellules tumorales, sont des fibroblastes et des lymphocytes. Les fibroblastes normaux sont obtenus à partir d'embryons de Souris C_3H et IC, de Rat et de Hamster, selon la technique classique de mise en culture. Après avoir prélevé les embryons âgés de 12 jours dans le cas des hamsters, de 14 jours dans les autres cas, ils sont lavés au PBS et découpés très finement en fragments de quelques mm^2 de surface. Les cellules sont dissociées à l'aide d'une solution de trypsine à 0,25 %. Pour obtenir des cellules en quantités suffisantes, trois trypsinisations successives au moins sont nécessaires. Après une centrifugation de 5 mn à 800 t/mn les cellules sont resuspendues dans du milieu 199 enrichi à 10 % de sérum de veau. Leur nombre est déterminé à l'aide d'une cellule de Malassez.

Les lymphocytes normaux sont obtenus à partir des ganglions axillaires, inguinaux et mésentériques de souris IC normales. Après prélèvement aseptique des différents ganglions dans du milieu 199, ils sont découpés avec des ciseaux en fragments très fins. Ces lymphocytes sont alors libérés dans le milieu par simple expression.

2°/ LE BENZOPYRENE

Le benzo(a)pyrène tritié (B(a)P-^{3}H 800 mCi/mM ou de 5800 mCi/mM ; Cea, France et Radiochemical Centre d'Amersham, Angleterre) est dissous dans du diméthylsulfoxide (DMSO) ou dans de l'acétone aux concentrations respectives de 31, 5 µg/ml et de 21,7 µg/ml. A partir de cette *solution-mère*, les diverses dilutions sont effectuées selon les exigences des expériences. La solution mère est conservée au froid (+ 4°) et à l'obscurité jusqu'au moment de l'emploi. Dans les expériences nécessitant des faibles concentrations, le B(a)P-^{3}H est employé seul. Par contre, les concentrations élevées sont réalisées par dilutions isotopiques du B(a)P radioactif. Dans ce cas, la quantité de B(a)P-^{3}H reste constante mais on lui ajoute des quantités décroissantes de B(a)P non marqué dilué progressivement dans le DMSO et respectivement égales à 100 µg, 50 µg, 25 µg, 12,5 µg, 6,25 µg par ml. La concentration la plus élevée de B(a)P en dilution isotopique mise en présence des cellules

et correspondant à 100 µg/ml est de 0,01 pour cent. Cette suspension est nettement opalescente. Ce n'est qu'à partir de la concentration de 0,0025 % (25 µg/ml) que la *solution* est totalement limpide.

Certaines expériences ont été effectuées en présence de B(a)P marqué au carbone 14 (Radiochemical Centre d'Amersham), d'activité spécifique 21 mCi/mM dissous dans du DMSO à la concentration de 24 µg/ml.

3°/ SCHEMA EXPERIMENTAL

La figure 3.1 schématise le processus général des expériences. La suspension cellulaire est préparée à la concentration désirée. Il en est distribuée 0,9 ml par tube à hémolyse. On ajoute 0,1 ml de la solution contenant le B(a)P-^{3}H seul, ou le B(a)P-^{3}H additionné du B(a)P non marqué (dilutions isotopiques). Les tubes à hémolyse disposés sur un portoir sont agités doucement afin d'obtenir une bonne homogénéisation et un bon contact entre les cellules et le B(a)P, puis laissés à 37° dans un bain-marie. Après le temps d'incubation désiré, les tubes sont centrifugés à 2000-3000 t/mn pendant un temps très bref (3 minutes) dans une centrifugeuse Jouan. Le surnageant est repris dans un autre tube. Les parois du tube contenant le culot cellulaire sont essuyées à l'aide d'un papier filtre afin de retirer toute la radioactivité extérieure aux cellules. Sur le culot on verse 1 ml d'eau distillée stérile, qui fait éclater les cellules. La radioactivité du surnageant et du culot est

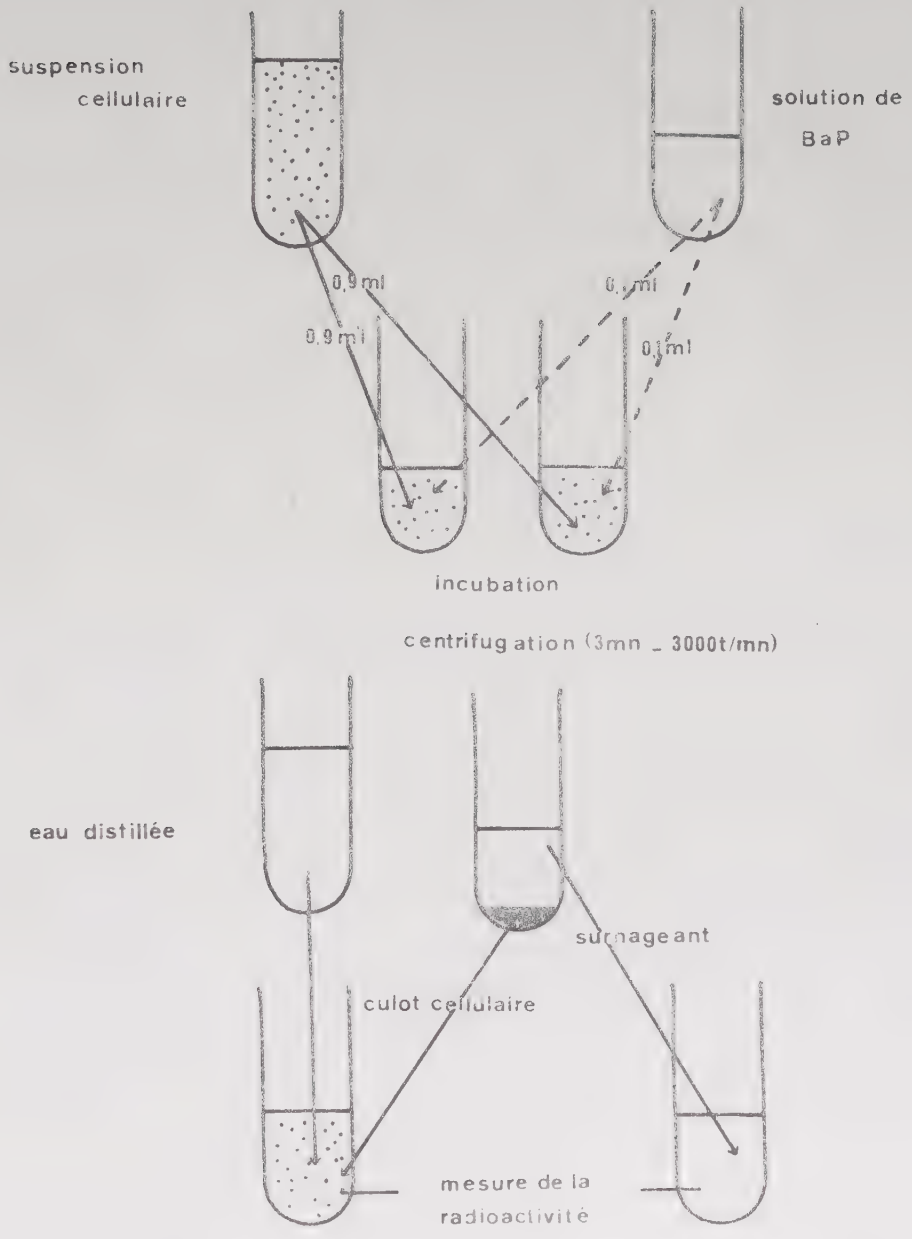


Figure 3.1 : SCHEMA GENERAL

mesurée au compteur à scintillation liquide (Packard Tricarb et Intertechnique). Une prise de 0,1 ml de chaque échantillon est ajoutée à 13 ml de liquide scintillant et d'éthanol absolu. Le liquide scintillant utilisé est composé de 100 mg de diméthyl POPOP (1,4bis 2-(4-méthyl-5-phényloxazolyl)-benzène, scintillation grade) et de 4 g de PPO (2,5-diphényl-oxazol, scintillation grade) pour 1 litre de toluène.

4°/ *ETUDES PRELIMINAIRES*

Nombre de tubes à hémolyse :

Pour chaque essai, nous utilisons deux tubes à hémolyse et pour chaque tube 2 à 5 mesures au scintillateur sont effectuées. Au début nos essais portaient sur 5 tubes. Mais l'analyse statistique des résultats a montré qu'il n'était pas nécessaire de multiplier ainsi les échantillons. Toutefois, le nombre de tubes est impérativement limité, la qualité des expériences dépendant de la rapidité à laquelle les manipulations se déroulent dans le temps. Nous n'avons pu excéder 26 tubes pour une même expérience.

Notons enfin que toutes les expériences sont répétées plusieurs fois.

Calcul de la quantité de B(a)P fixée par les cellules

La radioactivité totale des échantillons, des surnageants et des culots est exprimée en nombre de coups par minute (cpm) ou nombre de désintégrations par minute.

Nous avons pris l'habitude de calculer la moyenne de la radioactivité contenue dans les témoins et contenue dans les surnageants. Par différence, nous obtenons avec précision la radioactivité des cellules. En effet, le nombre de coups donnés par les cellules éclatées est soumis à des variations. A forte concentration cellulaire, il se forme après leur éclatement un coagulat qui rend les pipettages imprécis et fausse les mesures au scintillateur. De plus, étant donnée la grande quantité d'hydrocarbure fixée par les cellules, une légère variation de leur nombre entraîne une grande variation de la radioactivité. Le nombre de coups lus au scintillateur est alors transformé en quantité absolue de B(a)P fixée exprimée en microgrammes (µg) ou en picogrammes (pg).

Connaissant la radioactivité totale de l'échantillon, il est aisé de déterminer le pourcentage de radioactivité contenue dans le surnageant et par suite dans les cellules. Partant de ces pourcentages et des quantités réelles de B(a)P du système, nous déterminons la quantité absolue fixée soit par la totalité des cellules, soit par une seule cellule. Le tableau 3.I résume ces opérations successives. Dans la suite de notre exposé, nous ferons abstraction de ces calculs antérieurs, tous établis sur ce modèle ; seuls seront écrits les pourcentages ou les quantités de B(a)P fixé en µg ou en pg.

Tableau 3.I : Mode d'expression des résultats concernant la fixation du B(a)P par les cellules in vitro (2 exemples) (9 millions de cellules)

	Concentrations en µg/ml			
	B(a)P	6.250	12.5	25.	50.
	B(a)P-^{3}H	+ 0.1575	+ 0.1575	+ 0.1575	+ 0.1575
	Total	6.4075	12.6575	12.1575	50.1575
Cellules BP 8	T	18 372	18 372	18 372	18 372
	S	2 000	2 556	5 759	10 162
	C = T - S	16 372	15 816	12 613	8 210
	%	89,11	86,09	68,65	44,69
	Q µg	5,71	10,90	17,27	22,42
	Qpg/cell.	0,63	1,21	1,92	2,49
Cellules LS_1 IC	T	18 372	18 372	18 372	18 372
	S	3 398	6 896	10 405	12 019
	C = T - S	14 974	11 476	7 967	6 353
	%	81,50	62,46	43,36	34,58
	Q µg	5,22	7,91	9,17	17,34
	Qpg/cell.	0,58	0,88	1,02	1,93

T : radioactivité totale en cpm
S : radioactivité du surnageant (cpm)
C : radioactivité de la totalité des cellules (cpm)
% : pourcentage de B(a)P fixé par la totalité des cellules
Q µg : quantité en microgrammes fixée par la totalité des cellul
Qpg/cell. : quantité en picogrammes fixée par une seule cellule.

Lyse des cellules

Pour mesurer la radioactivité, les cellules sont dissoutes par la soude décinormale. Cependant, l'eau distillée peut efficacement et avec avantage la remplacer. L'action de l'eau distillée à la température ambiante est immédiate et les résultats satisfaisants. Par contre, l'action de la soude est lente, elle demande au moins 48 heures, à une température de 56° et parfois l'emploi d'ultra-sons est nécessaire. Le Tableau 3.II présente des résultats d'expériences où la soude, l'eau distillée et le milieu synthétique 199 (Gibco) ont été utilisés.

Tableau 3.II : Influence de la soude décinormale, de l'eau distillée et du milieu 199 sur les résultats, enregistrés (cpm).

	Expérience 1		Expérience 2	
	NaOH décinormale	H_2O distillée	H_2O distillée	199
S_1	15 078	14 487	52 152	55 632
S_2	1 034	980	-	-
Cellules	37 899	40 125	96 744	82 916
Total	54 011	55 592	148 896	138 548
Total témoins	58 613		154 567	

t° = 37° , T = 15 mn ; 10 x 10^6 cellules BP 8

Donc, dans les expériences où il s'avère indispensable de mesurer la radioactivité des cellules, nous utilisons soit l'eau distillée soit la soude en association avec un traitement aux ultra-sons.

Solvant

L'usage d'un solvant est imposé par la faible solubilité du B(a)P dans l'eau ou dans le milieu 199. Le DMSO (diméthylsulfoxide) et l'acétone tous deux miscibles à l'eau, permettent d'obtenir sinon une solution au moins une suspension homogène. L'un et l'autre donnent de bons résultats (tableau 3.III). Le DMSO a l'avantage sur l'acétone de moins s'évaporer à 37°.

Tableau 3.III : Influence du solvant sur les résultats.

	Cellules + 199 + B(a)P	Cellules + Acétone + B(a)P	Cellules + DMSO + B(a)P
Total	53 310	51 118	53 198
Surnageant	16 816	16 195	17 304
Cellules	36 494	34 923	35 894

t° = 37° ; B(a)P-^{3}H = 0,044 µg ; 18 x 10^{6} cell. LS_1IC

La concentration de ces deux solvants dans le système est relativement élevée (5,5 % pour le DMSO). Il fallait donc connaître leur effet toxique sur les cellules.

Deux aspects sont envisagés : leur toxicité *in vitro* sur les cellules tumorales et leur toxicité *in vivo* par greffe de cellules traitées par ces solvants

Tableau 3.IV : Toxicité du DMSO (exprimée en pourcentage de cellules mortes) pour les cellules BP 8 (10×10^6 cellules/ml ; t° = 37°)

Temps / DMSO dans le 199	0'	15'	30'	60'
10 %	4	5	12	17
10 % + 20 µg B(a)P	4	4	10,4	18
10 % + 40 µg B(a)P)	6,7	6,7	10,2	25

En effet, le tableau 3.IV montre qu'après 15 mn d'incubation la mortalité cellulaire augmente en présence de DMSO à 10 %. Aussi nous fixons à 15 mn la durée des incubations dans notre système expérimental et le DMSO est employé à la concentration de 5,5 % et 10 %.

La sensibilité *in vitro* des cellules LS_1IC est plus élevée (tableau 3,V). Aussi, nous en tiendrons compte dans les résultats de fixation quantitative.

Tableau 3.V : Mortalité en pourcentage des cellules BP 8 et LS_1IC en présence de 10 % de DMSO (t° = 37° ; 10 millions cellules/ml). (mortalité des témoins 4-5 %).

	Temps		
	0'	15'	60'
LS_1IC	0	17	42
BP 8	4	5	17

L'autre solvant utilisé, l'acétone est également toxique pour les cellules, surtout à 37° (tableau 3.VI). Par contre, cette toxicité est nulle à 0°. L'acétone est donc plus utile pour des études de fixation à basse température.

Tableau 3.VI : Toxicité de l'acétone pour les cellules BP8 (acétone 10 %, t° = 37° ; 10 millions cellules/ml) (mortalité des témoins 4-5 %).

Temps	0'	15'	30'	60'
% Mort.	8	8,1	9,4	10,4

In vivo, des souris ont reçu en injection sous-cutanée des cellules tumorales LS_1IC incubées au préalable dans du DMSO. Le tableau 3.VII montre que la date d'apparition des tumeurs est en rapport avec la concentration du DMSO et l'incidence des tumeurs est légèrement affectée ce qui est en rapport direct avec l'effet toxique et la diminution du nombre de cellules vivantes greffées.

Tableau 3.VII : Transplantabilité des cellules traitées au DMSO. Cellules LS_1IC, prétraitées avec du DMSO pendant 30 mn à 37° (10^6 cellules totales/animal)

Jours / % DMSO	6	10	13	17	24
0	2/10*	9/10	9/10	9/10	9/10
1	0/10	9/10	9/10	9/10	9/10
10	0/10	5/10	5/10	7/10	8/10

*Nombre d'animaux avec tumeur/nombre total

Vitesse de la centrifugation

Pour des raisons de rapidité dans le déroulement des expériences, une vitesse relativement élevée est choisie : 3 mn, à 3000 t/mn. Il est matériellement impossible de diminuer

cette valeur. Donc en réalité, l'incubation dure trois minutes de plus. Toutefois, les résultats de fixation ne changent pas si les tubes sont centrifugés à vitesse faible. Une centrifugation des cellules à 800 t/mn pendant 10 minutes laisse la fixation inchangée (tableau 3.VIII).

Tableau 3.VIII : Influence de la vitesse de centrifugation sur la fixation du B(a)P par les cellules

	800 t/mn 10 mn	3000 t/mn 3 mn
S	1561	1558
C	14836	14839
T	16397	

Néanmoins, dans les expériences de préfixation ou de présaturation où l'intégrité cellulaire s'impose la vitesse la plus faible est employée.

Rôle de l'agitation des cellules

Les cellules agitées fixent davantage de B(a)P (tableau 3.IX). En milieu agité, le contact entre les cellules et le B(a)P doit être plus intime qu'en absence de brassage des cellules. Ce phénomène est particulièrement net avec un petit nombre de cellules (10 millions), un grand nombre de cellules devant épuiser rapidement le B(a)P du milieu.

Tableau 3.IX : Quantité de B(a)P fixée par cellule (en picogrammes) après 15 mn d'incubation à 37°

Nombre de cellules / Milieu	1×10^7	2×10^7	4×10^7
non agité	17,06	10,9	5,84
agité	22,4	11,3	5,79

Cependant, une trop grande agitation est néfaste à la fixation, le contact entre les cellules et le B(a)P étant inhibé par une agglutination des cellules entre elles.

III - ASPECTS GENERAUX DE LA FIXATION

Après avoir analysé tous les facteurs susceptibles d'intervenir dans notre modèle expérimental, solvant, vitesse de centrifugation, agitation des cellules et désintégration cellulaire, il devenait possible d'entreprendre l'étude de la fixation du B(a)P sur des bases solides. Les études concernant la vitesse de fixation, les rapports entre la quantité de B(a)P fixée et sa concentration d'une part, ou le

nombre de cellules du système d'autre part sont établies avec des cellules tumorales BP8. Les faits principaux sont vérifiés sur d'autres types cellulaires (normal ou tumoral).

1°/ FIXATION PAR LES CELLULES BP 8

a) Vitesse de fixation

La fixation du B(a)P par les cellules *in vitro* est une réaction très rapide. En quelques minutes une grande quantité de B(a)P est déjà fixée (tableau 3.X, figure 3.2). Elle atteint un plateau entre la 5ème et la 10ème minute. Ce dernier dépend de la concentration du B(a)P. Plus la concentration du B(a)P dans le milieu est élevée, plus la fixation de la quantité maximale est lente ; le plateau est alors atteint plus tardivement. Inversement, le plateau est atteint d'autant plus vite que la concentration du B(a)P dans le milieu est plus faible.

Nous avons abaissé la température d'incubation à 0° afin de contrôler la vitesse de la fixation et de mieux analyser la nature de la réaction dans les temps courts. La figure 3.2 montre un faible ralentissement de la vitesse de fixation, une déformation de la courbe avant d'atteindre le plateau, enfin et surtout une diminution quantitative de la fixation pour les concentrations élevées. Il est possible

Tableau 3.X : Fixation du B(a)P en µg par 18 x 10^6 cellules (sarcome BP 8) en fonction du temps d'incubation, de la température et de la concentration du B(a)P

T°	Concentration du B(a)P en µg/ml	Temps d'incubation en minutes			
		2	5	10	25
37°	3.29	3.05	3.03	3.01	3.02
	6.41	5.86	5.71	5.87	5.92
	12.66	11.26	11.12	11.44	11.71
	25.16	19.30	22.[illegible]	22.95	23.27
	50.16	30.95	36.57	45.35	46.10
	100.16	53.09	66.01	88.44	87.14
0°	3.29	2.06	2.17	2.64	2.82
	6.41	2.46	2.70	4.15	5.08
	12.66	2.62	3.20	5.36	6.77
	25.16	2.57	4.60	8.38	10.82
	50.16	3.01	4.16	15.55	15.30
	100.16	8.14	12.32	27.24	33.25

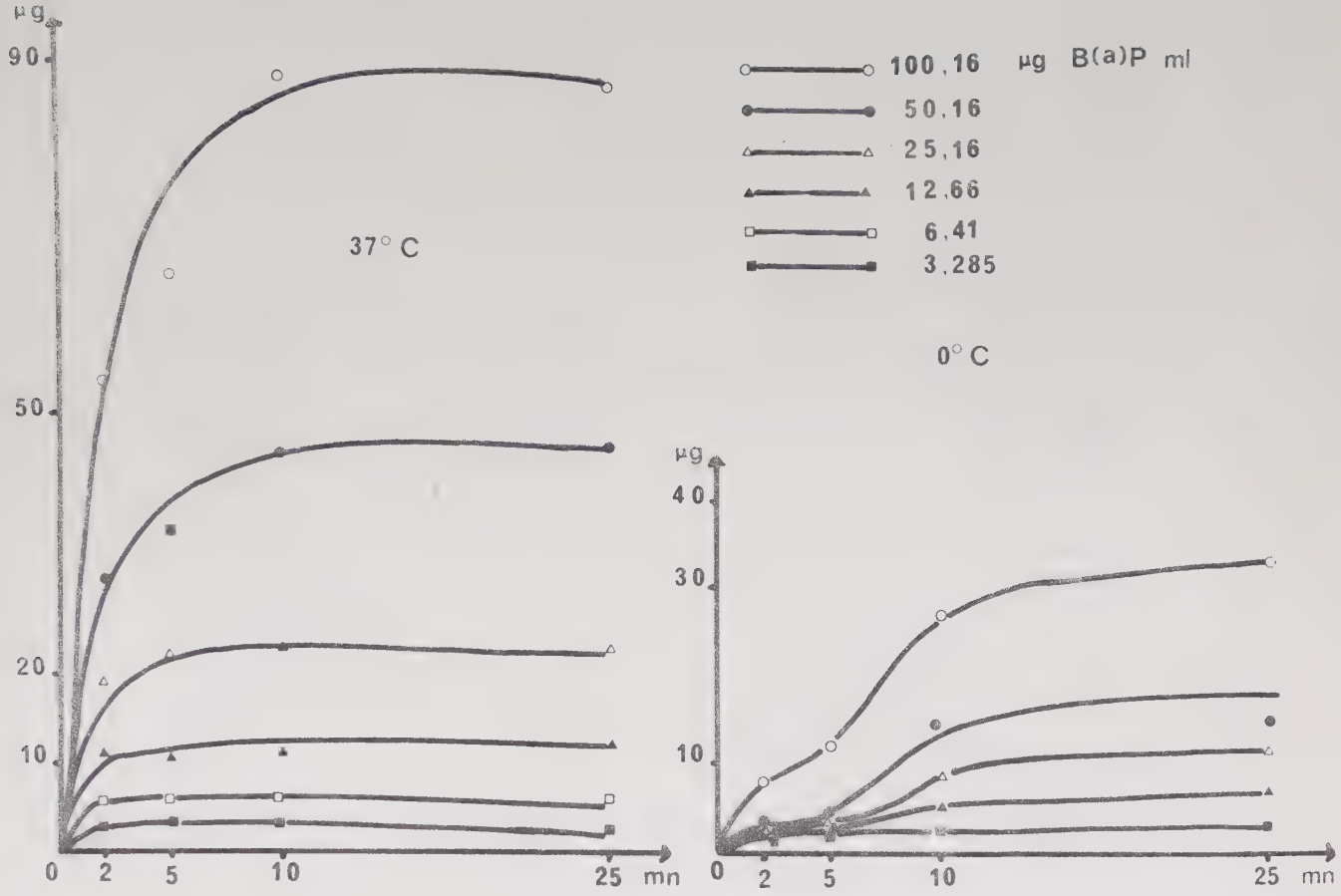


Figure 3.2 : QUANTITE TOTALE DE BaP FIXEE (en pg) EN FONCTION DU TEMPS. (Cellules Br 8)

qu'à 0° une partie de l'hydrocarbure soit cristallisé et ne soit plus disponible pour les cellules. De toute façon, le contrôle de la cinétique de fixation ne peut être effectué, pendant les premières minutes, du fait de la durée de la centrifugation.

b) Quantité de B(a)P fixée

La quantité de B(a)P fixée par les cellules est étudiée en fonction de sa concentration et du nombre de cellules dans le système, à température, temps d'incubation et volume constants.

- *En fonction de la concentration du B(a)P.* Pour un nombre déterminé de cellules, lorsque la concentration du B(a)P augmente, la quantité totale fixée, ainsi que la quantité fixée par une cellule augmentent de façon linéaire jusqu'à une certaine limite (tableaux 3.XI et 3.XII ; figures 3.3 et 3.4). Il est probable qu'il existe un point de saturation. Toutefois, les expériences à très fortes concentrations sont limitées par l'insolubilité du B(a)P et par son effet toxique.

- *En fonction du nombre de cellules.* Pour une concentration constante de B(a)P la quantité totale fixée augmente très faiblement avec le nombre de cellules (fig. 3.3). Par contre, la quantité de B(a)P fixée par une cellule croît d'autant plus que le nombre de cellules dans le système diminue (fig. 3.4), inversement, elle décroît avec l'augmentation du nombre de cellules (fig. 3.5).

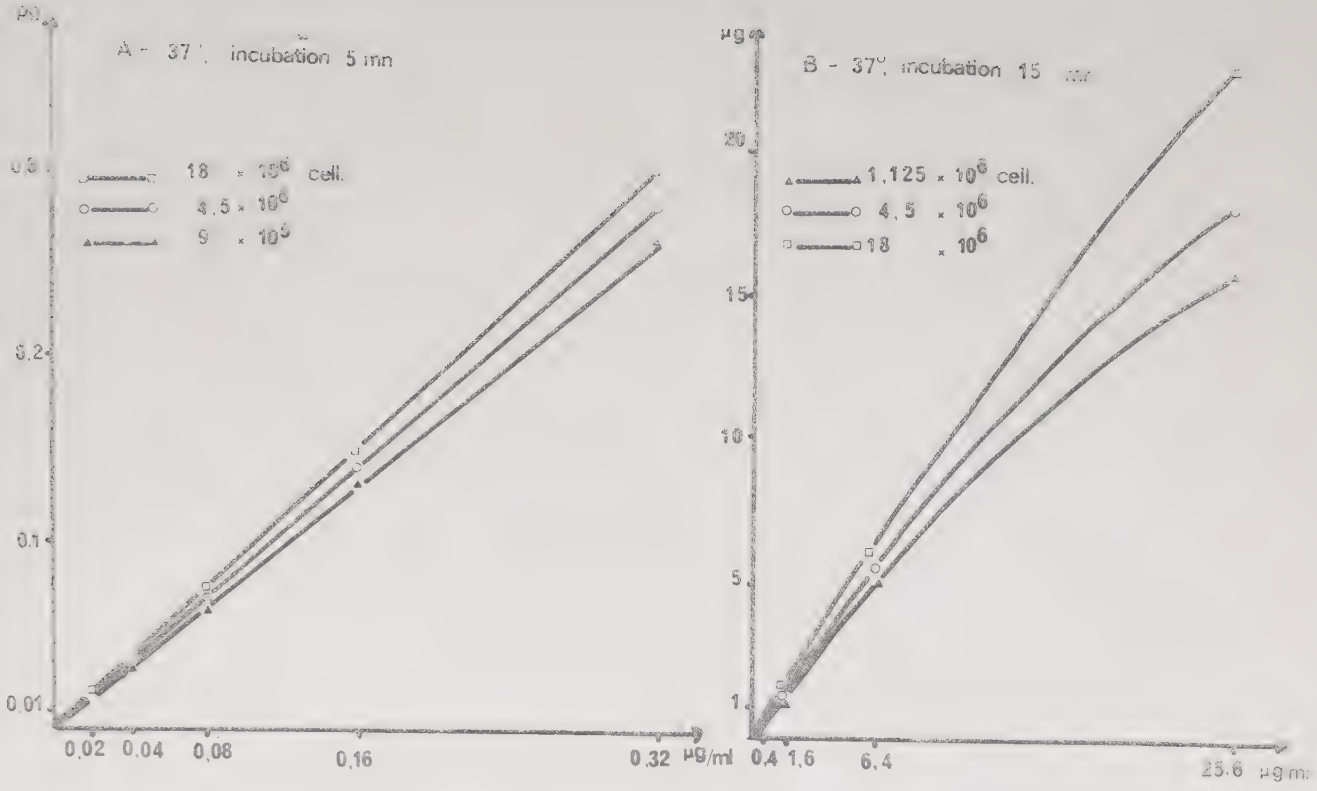
Tableau 3.XI : Quantité totale de B(a)P fixée en µg, en fonction de sa concentration et du nombre de cellules.

A - Concentrations faibles de B(a)P (Cell. BP 8 ; t° 37° ; 5 mn d'incubation)

Nombre de cellules x 10^6	Concentration du B(a)P en µg/ml				
	0,02	0,04	0,08	0,16	0,32
0,9	0,012	0,031	0,064	0,130	0,260
4,5	0,015	0,034	0,070	0,138	0,281
18	0,017	0,037	0,074	0,148	0,299

B - Concentrations fortes de B(a)P (Cell. BP 8 ; t° 37° ; 15 mn d'incubation).

Nombre de cellules x 10^6	Concentration du B(a)P en µg/ml				
	0,1	0,4	1,6	6,4	25,6
1,125	0,080	0,292	1,315	5,16	15,73
4,5	0,085	0,299	1,358	5,60	18,22
18	0,086	0,322	1,422	5,92	22,80



: QUANTITE TOTALE DE BaP FIXEE (en µg) EN FONCTION DE SA CONCENTRATION. A - FAIBLES CONCENTRATIONS, B - FORTES CONCENTRATIONS. (Cellules BP 8)

Tableau 3.XII : Quantité de B(a)P fixée (en pg et par cellule) en fonction de sa concentration et du nombre de cellules.

A - Concentrations faibles de B(a)P (Cell. PB 8 ; t° 37° ; 5 mn d'incubation).

Nombre de cellules x 10^6	Concentration de B(a)P en µg/ml				
	0,02	0,04	0,08	0,16	0,32
0,9	0,014	0,035	0,071	0,144	0,290
4,5	0,003	0,008	0,016	0,030	0,063
18	0,0009	0,002	0,004	0,008	0,014

B - Concentrations fortes de B(a)P (Cell. BP 8 ; t°37° ; 15 mn d'incubation).

Nombre de cellules x 10^6	Concentration de B(a)P en µg/ml				
	0,1	0,4	1,6	6,4	25,6
1,125	0,07	0,262	1,169	4,586	13,979
4,5	0,019	0,066	0,302	1,245	4,051
18	0,005	0,018	0,079	0,329	1,267

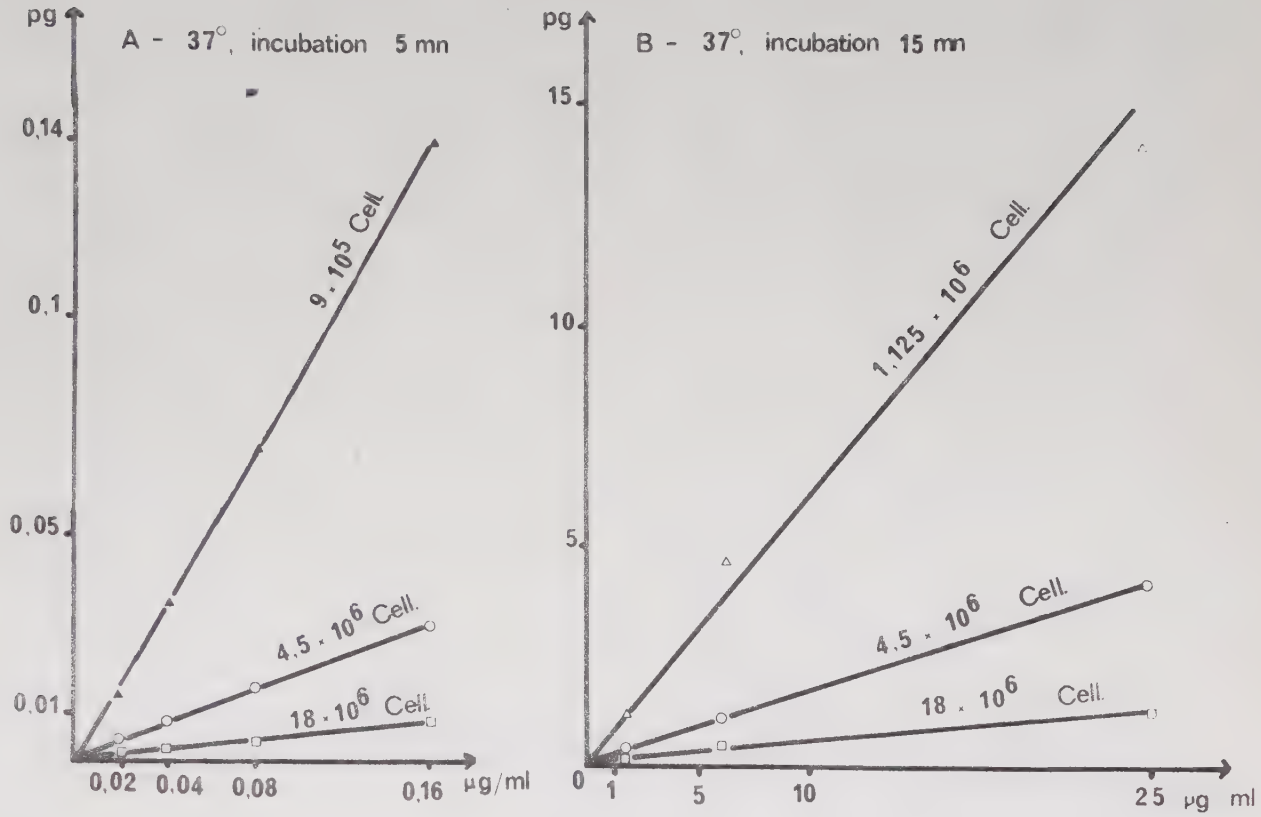


Figure 3.4 : QUANTITE DE BaP FIXEE (en pg) PAR UNE CELLULE (BP 8) EN FONCTION DE SA CONCENTRATION. A - CONCENTRATIONS FAIBLES. B - CONCENTRATIONS FORTES.

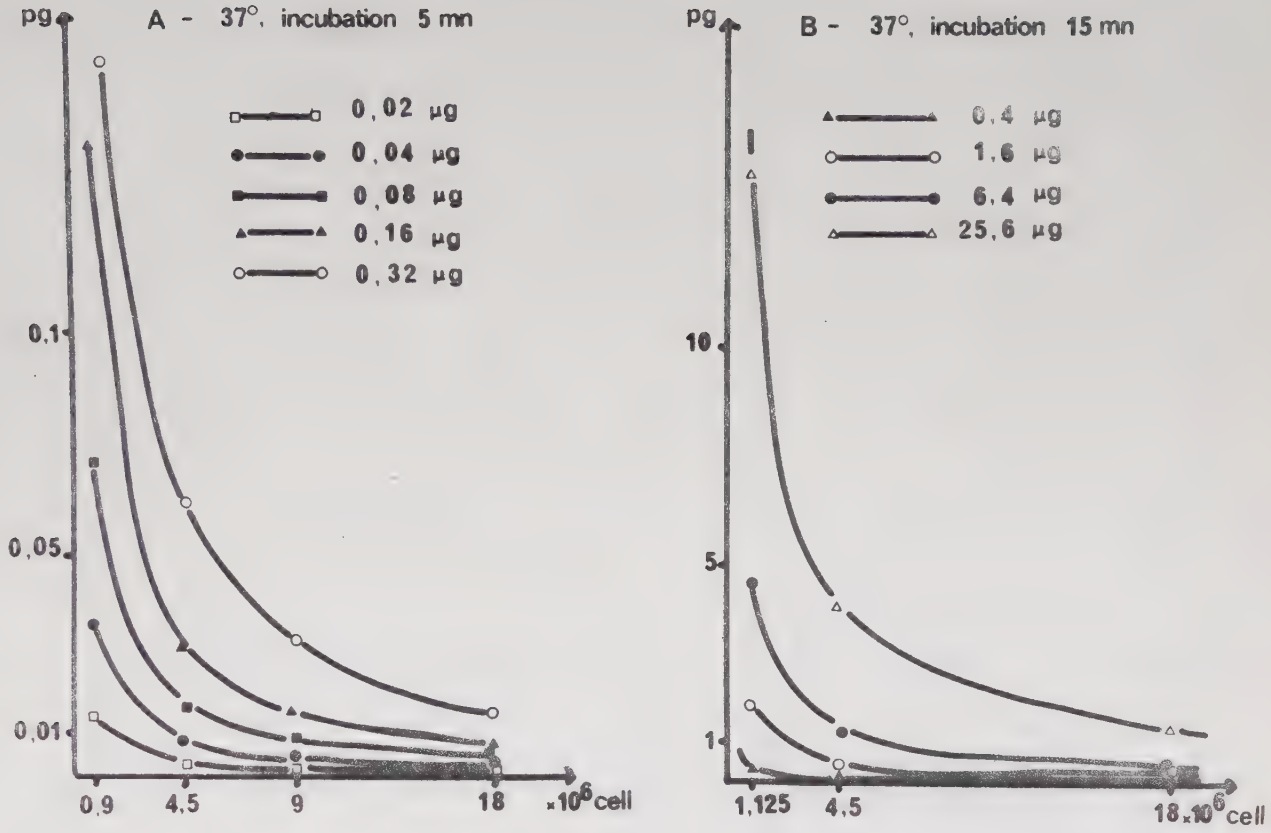


Figure 3.5 : QUANTITE DE BaP FIXEE PAR CELLULE (en pg) EN FONCTION DU NOMBRE DE CELLULES. A - CONCENTRATIONS FAIBLES DE BaP. B - CONCENTRATIONS FORTES DE BaP.

c) En conclusion :

- la fixation est une réaction très rapide au cours de laquelle la quantité de B(a)P fixée par les cellules ou par une seule cellule est proportionnelle à la concentration du B(a)P.

- la quantité de B(a)P fixée par une cellule est inversement proportionnelle au nombre de cellules du système alors que le pourcentage de B(a)P fixé par les cellules augmente avec leur nombre, pour une concentration donnée.

2°/ FIXATION DU B(a)P PAR D'AUTRES TYPES CELLULAIRES

Les résultats énoncés ci-dessus étant observés avec des cellules tumorales BP 8, il fallait vérifier si les mêmes principes pouvaient s'appliquer aux autres types cellulaires. Dans ce but, de nombreuses expériences sont réalisées avec des lymphocytes normaux ou tumoraux, et des fibroblastes normaux de Souris, de Hamster et de Rat. Le B(a)P utilisé est marqué soit au ^{3}H soit au ^{14}C. Mais le marquage n'influence pas la fixation pour nos expériences faites à court terme.

Les résultats de la fixation du B(a)P par ces divers types histologiques sont en tous points comparables aux observations faites sur les cellules BP 8. Le tableau 3.XIII et la figure 3.6-A montrent de façon comparative la quantité de B(a)P fixée par les cellules sarcomateuses BP 8 (souris C_3H), les fibroblastes normaux (souris C_3H), les cellules du lymphosarcome LS_1IC et les lymphocytes normaux (souris C3H).

Il est à noter :

- que *les cellules tumorales (BP 8 et LS1-IC) fixent beaucoup plus de B(a)P (30-40 % de plus) que les cellules normales respectives ;*

- et que *les cellules fibroblastiques (tumorales ou normales) fixent davantage que les lymphocytes (tumoraux ou normaux).*

Une première explication peut être apportée en invoquant le rôle de la taille cellulaire. Pour s'en assurer les diamètres de ces cellules sont mesurés et la surface cellulaire est calculée. Cette dernière est choisie car la fixation précoce du B(a)P est probablement localisée au niveau de la membrane cellulaire et surtout sur ses constituants lipidiques. Le tableau 3. XIV et la figure 3.6 B montrent la quantité de B(a)P fixée par μ^2 de surface cellulaire. Les résultats ainsi présentés font apparaître *que les cellules normales fixent plus que leurs homologues tumoraux*. Cependant, il ne faut pas se hâter de conclure. Compte tenu de la nature et du nombre de microvillosités membranaires des types cellulaires étudiés, la surface exacte des cellules ne peut être correctement déterminée par nos techniques.

Une deuxième explication peut alors être trouvée dans la physiologie et la constitution biochimique propres à chaque type cellulaire, qui peuvent être à l'origine des différences observées quant aux quantités de B(a)P fixées. Mais par manque de compétence nous ne discuterons pas cet aspect. Quoiqu'il en soit, la *nature de la fixation* du B(a)P

Tableau 3.XIII : Quantité de B(a)P fixée en picogrammes et par cellule en fonction de sa concentration et du type cellulaire.
(t° : 37° ; t : 15 mn)

Types cellulaires	Nbre cell. x 10^6	Concentration du B(a)P en µg		
		6	12	24
tumoraux	9	0,57	0,94	1,54
LS_1IC	18	0,30	0,57	1,02
normaux	9	0,35	0,60	1,27
IC	18	0,20	0,31	0,43
tumoraux	9	0,62	1,22	1,86
BP8 (C_3H)	18	0,32	0,63	1,06
fibroblas-tiques	9	0,38	0,71	1,10
C_3H	18	0,23	0,40	0,68
Hamster	9	0,51	0,78	1,39
	18	0,25	0,45	1,09
Rat	8	0,25	0,5	1,15
	16	0,20	0,39	0,78

Tableau 3.XIV : Quantité de B(a)P fixée, en pg, par μ^2 de surface cellulaire : cellules normales et tumorales de souris (t° : 37° ; incubation 15 mn)

Type cellulaire	Diamètre d'une cellule µ	Surface d'une cellule μ^2	Concentration en B(a)P en µg		
			6	12	24
BP 8	15,4	745	0,0008	0,0016	0,0025
LS_1IC	10,5	346	0,0016	0,0027	0,0045
Fib. C_3H	9,5	284	0,0013	0,0025	0,0039
Lym. n.	7	154	0,0023	0,0039	0,008

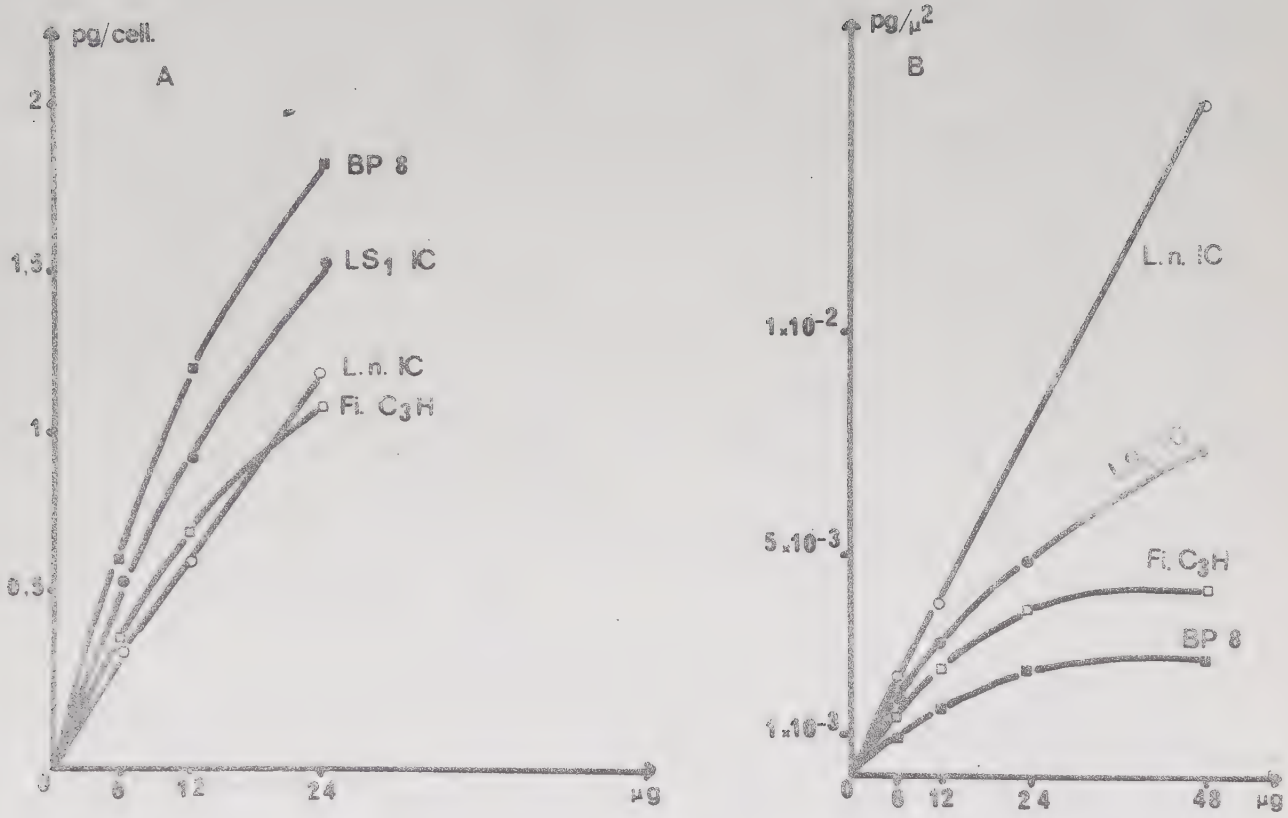


Figure 3.6 : FIXATION DU BaP (en pg) PAR : A - CELLULE TUMORALE BP 8, CELLULE TUMORALE LYMPHOCYTAIRE (LS1-IC) FIBROBLASTE NORMAL (F.n. C_3H) et LYMPHOCYTE NORMAL (L.n. IC). B - PAR μ^2 DE SURFACE CELLULAIRE.

est à l'origine des différences observées, mais elle n'est pas bien connue. Si la fixation est une simple *adsorption* et si le système de microvillosités et des plis membraneux sont plus développés chez les cellules normales et chez les lymphocytes normaux, la 1ère explication semble la plus vraisemblable. La fixation peut aussi être due à un phénomène de *solubilité*. Le B(a)P est en effet très soluble dans les lipides et presqu'insoluble dans l'eau. Les cellules contenant des lipides et notre milieu n'en contenant pas (milieu 199) le B(a)P par simple coefficient de partage sera capté par les lipides cellulaires, en plus ou moins grande quantité selon leur physiologie.

Nous ne disposons d'aucun argument permettant de conclure en faveur de l'une ou l'autre hypothèse. De plus, la fixation du B(a)P obéit peut-être à des modalités différentes de celles envisagées. Afin de répondre à cette question, le chapitre suivant sera consacré à l'étude de la nature de la fixation. Auparavant, nous résumons très brièvement les conclusions déjà obtenues :

- *Les cellules, tumorales et normales obéissent aux mêmes lois de la fixation (vitesse, quantité fixée par rapport à la concentration d'hydrocarbures, quantité fixée par rapport au nombre de cellules).*

- *Les cellules normales fixent par unité de surface plus que les cellules tumorales.*

- La quantité fixée varie d'après les types cellulaires.

- Les deux hypothèses qui tentent d'expliquer ces variations mettent en jeu la nature de la fixation.

IV - NATURE DE LA FIXATION

La littérature fait état de la nature complexe de la fixation des hydrocarbures cancérogènes (ALLISON et coll., 1964). D'ailleurs nous avons vu que les méthodes utilisées pour la mise en évidence de cette fixation ne sont pas suffisamment précises. DIAMOND (1969) après traitement des cellules de hamster avec du DMBA-^{3}H a réussi à extraire avec du Carnoy, fixateur des cellules et solvant des lipides, 90 % de la dose de DMBA fixée. Ces résultats montrent la probabilité d'une relation étroite entre les lipides cellulaires et la fixation de l'hydrocarbure. Nous avons alors adopté l'appellation de *fixation labile* quand les solvants organiques arrivent à extraire le B(a)P et *fixation stable* la partie restante et supposée liée assez étroitement avec des constituants non lipidiques.

1°/ MATERIEL ET METHODES

Notre technique initiale de fixation a été adaptée pour séparer expérimentalement la quantité de B(a)P fixée de façon labile, de la quantité fixée de façon stable. La

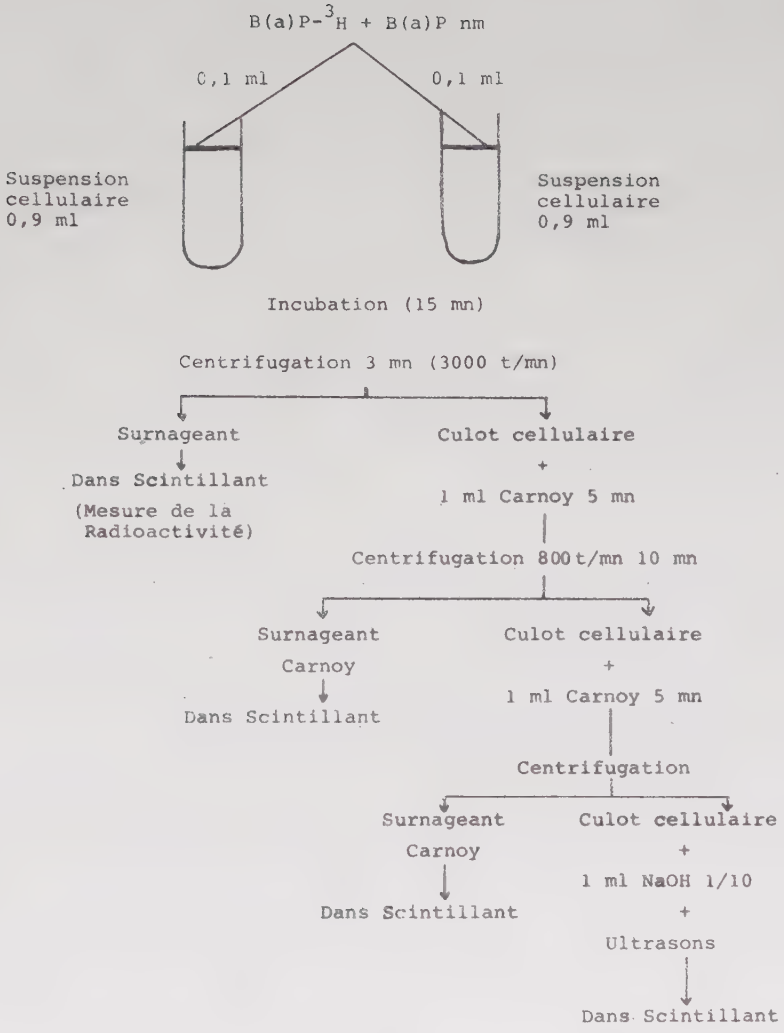


Figure 3.7 : Fixation Stable, Fixation Labile :
Schéma Expérimental.

figure 3.7 résume le processus opératoire. Le début des manipulations, suit le schéma expérimental décrit plus haut (page 72). Mais après centrifugation, le culot cellulaire est resuspendu dans un millilitre de Carnoy (2 volumes d'alcool absolu et 1 volume d'éther). Cinq minutes après, la suspension est centrifugée pendant 10 mn à 800 t/mn. Après répétition de cette opération le culot cellulaire est alors soumis à l'action de la soude décinormale. Pour accélérer la destruction cellulaire, les tubes sont passés aux ultra-sons et gardés à l'étuve à 56° toute la nuit.

Des essais ont été effectués avec divers solvants, tels le chloroforme, l'alcool, l'acide acétique glacial, etc .... Le carnoy modifié a été choisi pour la qualité des résultats obtenus.

La radioactivité du surnageant (Carnoy) et des débris cellulaires (soude) est alors mesurée au spectromètre à scintillation liquide. La radioactivité du surnageant-carnoy représente la quantité de B(a)P fixée de façon labile ; la radioactivité de la soude représente la quantité de B(a)P fixée de façon stable.

Les calculs sont faits comme décrits au début du chapitre, à l'exception du calcul de la dose totale de B(a)P ; elle est obtenue par addition de la radioactivité contenue dans le surnageant Carnoy et celle de la soude.

2°/ RESULTATS

La fixation est étudiée avec des cellules tumorales BP 8 et LS_1IC de notre système expérimental in vitro, ainsi qu'avec des fibroblastes embryonnaires de hamster en culture de tissus. Nous avons eu recours à la culture de tissus pour suivre la fixation pendant des périodes relativement longues (un jour ou deux jours). En effet, notre modèle expérimental *in vitro* ne permet pas la survie des cellules au delà de quelques heures. Aussi, il n'est utilisé que pour l'étude de la fixation stable et labile lors de temps courts ne dépassant pas 6 heures.

a) Fixation stable et fixation labile pendant les 6 premières heures

Le B(a)P en dilution isotopique (6,57 µg/ml) est mis en contact avec les cellules BP 8 et LS_1IC pendant des intervalles de temps croissant de 10 minutes à 6 heures, dans les conditions expérimentales décrites précédemment.

Le tableau 3.XV indique les résultats.

Tableau 3.XV : Fixation stable et labile (en % et en µg) en fonction du temps et de la dose de B(a)P (18 millions de cellules, 6,57 µg de B(a)P

		Temps					
		10'	30'	60'	120'	240'	360'
Fixation labile	%	83,8	84,6	87,9	87,8	86,7	83,9
	µg	5,50	5,55	5,78	5,76	5,70	5,51
Fixation stable	%	6,6	6,5	6,5	7,2	7,5	8,2
	µg	0,43	0,43	0,43	0,47	0,49	0,54

Une fixation stable est constatée, évaluée à 6,5-8 % de la fixation totale ; la fixation labile de beaucoup plus élevée représente 92 % à 94 % de la fixation totale. Mais, il faut signaler que cette série d'expériences est réalisée avec du B(a)P stocké. Aussi, nous avons jugé utile de faire une analyse chromatographique, qui a démontré la présence de produits de dégradation. Nous avons donc renouvelé cette expérience avec du B(a)P radioactif neuf et purifié à 98 % par chromatographie sur couche mince de gel de silice sans employer les dilutions isotopiques. Dans ces conditions, après fixation et extraction par le Carnoy, tout le B(a)P est localisé dans ce solvant. Ainsi, seule une fixation labile est mise en évidence. La fixation stable, si elle existe, n'est pas immédiate.

Ces expériences montrent que la fixation stable est en relation avec la présence de métabolites du B(a)P. Dans le cas de B(a)P non purifié, ces métabolites sont disponibles expliquant une fixation stable presque immédiate ; tandis que dans le cas du B(a)P purifié, les cellules doivent intervenir pour le dégrader. Or, pour ce faire, un temps de latence très court semble indispensable. L'expérience suivante en apporte la preuve.

b) Fixation stable en fonction du temps

Les fibroblastes de Hamster sont cultivés en nappe, puis traités respectivement 24 h et 48 h avec du B(a)P purifié, uniformément marqué au tritium. A titre de comparaison, les

témoins sont traités 15 minutes seulement. Ils sont alors décollés, comptés, puis fixés au Carnoy. Ensuite les manipulations d'extraction suivent le schéma cité plus haut.

Tableau 3. XVI : Fibroblastes de Hamster cultivés : fixation stable et fixation labile en pourcentage et en fonction du temps.

Durée du traitement	15'	24 h	48 h
Fixation stable (%)	1,0	26,2	30,70
Fixation labile (%)	98,9	73,8	69,3

Du tableau 3.XVI, nous constatons que dès les premières 15 minutes 1 % de la quantité totale du B(a)P fixé est retrouvé dans la soude. Quoique très faible cette fixation stable est valable. Un grand nombre de mesures l'ont prouvée. De plus des essais de lavage des cellules par différents solvants (méthanol, éthanol, acétone) n'ont pas modifié ces résultats. Il est probable cependant, que ce pourcentage soit dû à des produits de dégradations toujours présents (2 %) après purification de la substance. Le tableau 3. XV confirme cette assertion. La partie fixée de façon stable est constante les 3-4 premières heures et correspond aux impuretés. Ce n'est qu'à partir de la 4ème heure que cette quantité augmente.

Un deuxième fait se dégage nettement dans le tableau 3. XVI : la fixation stable augmente avec le temps. Le pourcentage de B(a)P fixé de façon stable est au bout de 24 et 48 heures respectivement 26 et 30,7 %. Ces pourcentages élevés par rapport aux résultats du tableau 3.XV (5-6 %) s'expliquent par la faible quantité de B(a)P dans le système 0,1 µg environ pour 6,57 µg dans l'expérience précédente.

c) Discussion et conclusion.

Les faits exposés ci-dessus démontrent qu'au début de l'expérience, la fixation du B(a)P est probablement liée aux lipides de façon labile. Ce n'est qu'au bout de 3-4 heures après la mise au contact qu'une fixation stable s'établit progressivement. Il est vraisemblable que cette fixation stable du B(a)P soit en rapport avec son métabolisme. L'expérience réalisée avec le B(a)P impur (tableau 3. XV) est en faveur de cette hypothèse. Nous avons essayé de voir indirectement ce métabolisme, en analysant les surnageants des cultures. L'extraction par des solvants organiques et la chromatographie sur couche mince de gel de silice n'ont montré des métabolites dans le milieu qu'après les six premières heures. Ces résultats sont en contradiction avec ceux de DUNCAN et coll., (1969), DIAMOND (1971) et BROOKES et DUNCAN (1971), qui étudiant les dérivés hydrosolubles du B(a)P ont trouvé des métabolites en assez forte quantité dès les deux premières heures. Le problème dépassant notre sujet et nos études étant incomplètes nous nous abstiendrons de faire une discussion critique. D'autant plus que nous n'avons aucune certitude qu'une corrélation

existe entre la fixation stable et le rejet des métabolites dans le milieu.

En conclusion, dans les premières heures le B(a)P est fixé de façon labile. Ce n'est qu'au bout de 3-4 heures qu'une fixation stable commence à s'établir. Cette dernière est probablement liée au métabolisme intracellulaire du B(a)P. Des études complémentaires sont indispensables pour vérifier cette hypothèse et analyser plus en détail la fixation stable.

DISCUSSION GENERALE

Ce travail traite des propriétés biologiques du benzo(a)pyrène-B(a)P, un hydrocarbure polycyclique. Une revue historique a montré que, *in vivo*, le B(a)P induit des tumeurs locales ou à distance. En culture de tissus, il se manifeste par une toxicité et par un effet cancérogène. Nous avons donc successivement étudié l'action cancérogène du B(a)P sur la peau de souris, puis son action toxique et cancérogène sur des fibroblastes de Rat et de Hamster en culture de tissus, et enfin dans le troisième chapitre, la pénétration dans les cellules, étude quantitative réalisée à l'aide d'un système expérimental simple *in vitro*.

Le premier chapitre traite des effets du B(a)P sur la peau de souris après une ou plusieurs applications, à des doses variables. Ils se manifestent par des lésions précoces et des lésions tardives. Les lésions précoces étant une disparition des glandes sébacées et une hyperplasie de l'épiderme, sont étudiées 8 jours après le début du traitement. Elles sont liées directement à la concentration du B(a)P et semblent dépendre de son action cancérogène. Les lésions tardives, papillomes et épithéliomas sont en relation

directe avec la dose du cancérogène. Plus celle-ci est grande, plus l'incidence tumorale est élevée, et plus le temps de latence est court. De plus, le fractionnement de la dose augmente l'incidence et diminue le temps de latence des tumeurs.

L'action du B(a)P se manifeste donc à court terme par la disparition des glandes sébacées et par une hyperplasie épidermique et à long terme par le développement de tumeurs bénignes puis de tumeurs malignes. La disparition des glandes sébacées peut s'expliquer par un effet toxique du B(a)P qui, liposoluble, entraînerait leur destruction. Ce ménanisme ne peut être invoqué pour l'hyperplasie qui est une prolifération excessive de cellules. Elle est certainement provoquée par une diminution de la durée mitotique ; il est prouvé(EVENSEN, 1962) en effet qu'après traitement par le B(a)P un bref blocage de la synthèse d'ADN se produit suivi aussitôt d'une augmentation de cette dernière, dépassant alors le taux de synthèse normale. La kératinisation, est également accélérée mais moins que le rythme mitotique, provoquant ainsi une hyperplasie. Celle-ci, peut être considérée comme le précurseur des tumeurs. En effet, une hyperplasie locale est toujours observée avant la manifestation tumorale. En adoptant l'hypothèse de BERENBLUM quant à l'induction de tumeurs par des substances chimiques en deux phases (initiation et promotion), l'hyperplasie, lésion réversible, et produite par des corps non cancérogènes, se situe comme les

papillomes et les épithéliomas, dans la deuxième phase ou la promotion. La promotion est la manifestation visible de l'état d'initiation. La première phase ou initiation transforme les cellules normales en cellules cancéreuses latentes. Elle s'effectue les trois premiers jours après le traitement et est une modification brutale, irréversible de la cellule, transmise après mitoses aux cellules filles ; mais elle n'est définie par aucun critère morphologique ou biologique.

Le deuxième chapitre est consacré aux effets biologiques du B(a)P (toxicité et effet transformant) sur des fibroblastes de Hamster et de Rat en culture de tissus. Cette étude est effectuée par la méthode de clonage : formation de colonies à partir d'une seule cellule dans des conditions expérimentales bien déterminées. Le pourcentage de colonies obtenues en fonction du nombre de cellules ensemencées détermine *l'efficacité de clonage*.

La toxicité du B(a)P s'exprime par une diminution de l'efficacité de clonage. Pour les cellules normales, elle augmente avec la concentration ou la dose de l'hydrocarbure ainsi qu'avec la durée du traitement. Au cours de la transformation la toxicité diminue, les cellules transformées formant des colonies plus facilement. Aussi les deux phénomènes interfèrent-ils entraînant une modification de la courbe de toxicité. Elle cesse alors de croître linéairement, atteint un plateau et même décroît tandis que la dose d'hydrocarbure augmente.

La toxicité du B(a)P est donc plus faible pour les cellules transformées que pour les cellules normales. Certains auteurs (DIAMOND, 1969, 1971 ; BROOKES, 1971) pensent que cet effet toxique est lié au métabolisme du B(a)P, les cellules résistantes, donc les cellules tumorales ne métabolisant pas cette substance. D'après nos résultats de pénétration du B(a)P, exposés au chapitre III, il convient de souligner que les cellules tumorales, compte tenu de leur taille, fixent moins que les cellules normales. La toxicité dépend donc également de la quantité d'hydrocarbure qui peut pénétrer dans une cellule. Le facteur quantité précède le facteur métabolisme.

En ce qui concerne le métabolisme, il n'est pas encore déterminé si l'effet toxique est dû aux réactions chimiques entre les constituants biochimiques cellulaires et le B(a)P ou à l'accumulation des métabolites excrétés dans le milieu (puisque les études sont faites en culture de tissus). Des expériences que nous avons réalisées *in vitro* et non citées donnent des arguments en faveur de la dernière hypothèse, c'est-à-dire, à l'accumulation des métabolites dans le milieu. Ce phénomène n'est en général pas observé *in vivo*, où une élimination continue des métabolites s'établit très rapidement (GENTIL et Coll., 1971 ; GENTIL et Coll., soumis à publication, 1973). Toutefois, le mécanisme de la toxicité du B(a)P n'est pas encore élucidé. Son approfondissement impliquant la transformation des cellules par les

métabolites constitue l'une de nos perspectives de travail.

. *La transformation des fibroblastes par le B(a)P* est définie par la morphologie particulière des colonies : arrangement désordonné ou superposition par perte d'inhibition de contact des cellules. L'efficacité de transformation représente le nombre de colonies transformées d'après ce critère, par rapport au nombre total de colonies.

Si les cellules sont traitées à court terme, lors du clonage en milieu liquide enrichi par une couche nourricière de cellules irradiées (technique de DI PAOLO) l'efficacité de transformation est faible ; elle augmente avec la dose de B(a)P jusqu'à une valeur égale de 5,9 %. Le faible pourcentage de transformation, les variations dans les résultats, la difficulté d'interprétation de la morphologie des colonies, nous ont contraints à effectuer de nombreuses expériences comportant une grande quantité de boites de Pétri. Néanmoins, cette technique n'est pas suffisamment précise pour permettre une interprétation correcte de la transformation. Nous avons dû essayer d'autres méthodes. Le clonage sur gel d'agarose très efficace et utile dans *l'étude de l'action à long terme du B(a)P* sur des fibroblastes, a été effectué dans le but de vérifier *in vitro*, l'hypothèse de la transformation en deux phases (initiation, promotion) énoncée *"in vivo"* par BERENBLUM.

Des fibroblastes de Rat, cultivés en nappe cellulaire sont initiés avec du B(a)P (1µg/ml de milieu) pendant

deux heures puis sont soumis à l'action continue d'un promoteur : l'ester de phorbol (0,01 µg/ml de milieu). La transformation est suivie par l'examen morphologique des colonies obtenues par la technique de clonage en boites de Pétri et par clonage sur gel d'agarose, les cellules transformées formant des colonies tridimensionnelles. Cette transformation est confirmée par réimplantation des cellules sur animal. L'injection sous cutanée au niveau du crâne de rats nouveau-nés, de 2 millions de cellules traitées par le B(a)P puis l'ester de phorbol entraîne le développement de sarcomes de type chimique. Tous les animaux (10/10) ont développé des tumeurs, alors qu'une seule tumeur a été observée sur les animaux ayant reçu des cellules traitées uniquement avec le B(a)P. Les cellules traitées avec l'ester de phorbol seul et les cellules non traitées n'ont pas formé de colonies sur gel d'agarose et n'ont pas entraîné l'apparition de tumeurs après leur inoculation sur animal.

Par ces résultats, nous avons prouvé que les fibroblastes, cellules conjonctives, peuvent être transformés en deux phases et que la cocancérogenèse (initiation et promotion) peut être réalisée en culture de tissus. Il nous reste à vérifier cette hypothèse sur d'autres corps cancérogènes tel le 7,12-diméthylbenz(a)anthracène (DMBA), l'uréthane, etc... De plus, nous comptons employer cette méthode pour classer les diverses substances en initiateur et en promoteur.

Enfin, la preuve est faite que la formation de colonies tridimensionnelles en milieu gélifié est un bon critère de transformation cellulaire. Une fois quantifiée, cette technique doit permettre de tester le pouvoir cancérogène de corps variés déterminant l'indice de transformation.

Une dernière perspective, qui n'est pas la moins importante, est ouverte : la possibilité de suivre tous les stades de la transformation cellulaire, en particulier de sérier (disséquer) la phase d'initiation en notant l'apparition et le développement des colonies dans le temps.

Ainsi, la transformation de cellules conjonctives donne une signification plus générale à la théorie de la cocancérogenèse ou transformation en deux phases.

Dans le troisième chapitre, se trouve réalisée une étude quantitative de la pénétration et de la fixation du B(a)P au niveau cellulaire. Les techniques de fluorescence et d'autohistoradiographie utilisées à ce dessein nous ont paru insuffisantes. Aussi, avons-nous mis au point un modèle expérimental simple *in vitro* en employant la scintillation comme méthode quantitative de mesure.

Des cellules normales et ascitiques en nombre bien déterminé sont incubées dans un bain-marie à 37°, en présence de B(a)P tritié de concentration connue, pendant des intervalles de temps bien définis. Ce système dont tous les facteurs sont contrôlables permet d'étudier quantitativement la fraction de B(a)P qui peut réellement pénétrer dans la cellule

dès les premières minutes (5 mn - 15 mn) de la mise en contact avec l'hydrocarbure.

Cette pénétration obéit à certaines modalités :

- la vitesse de la réaction est très rapide. Après une incubation de 10 mn, 90 % de la quantité de B(a)P mis au contact des cellules sont fixés. Cette valeur n'est d'ailleurs pas dépassée, un plateau étant atteint entre la 5ème et la 10ème minute.

- Les cellules fixent des quantités d'hydrocarbure considérables, croissant avec la concentration du B(a)P et avec le nombre de cellules du système. La quantité fixée par une cellule est inversement proportionnelle au nombre de cellules du système, alors que le pourcentage de B(a)P fixé par les cellules augmente avec leur nombre pour une concentration donnée.

- La fixation dépend du type cellulaire. De plus les cellules normales fixent par unité de surface plus que les cellules tumorales. Seules des hypothèses peuvent expliquer ces différences de pénétration. La nature de la fixation intervient certainement. Mais elle est encore mal connue.

Nos expériences démontrent que pendant les 15 premières minutes le B(a)P pénètre dans les cellules, mais il peut être extrait par des solvants organiques tel le Carnoy. Il s'agit probablement de *"fixation labile"* en rapport avec les lipides cellulaires. Ce n'est qu'après

une période de trois heures qu'une fixation stable s'établit ; le B(a)P ne peut plus être extrait dans sa totalité par les solvants organiques même après de nombreux lavages à l'alcool méthylique, l'alcool éthylique, l'acétone, l'eau distillée. Cette fixation est intimement liée au métabolisme cellulaire car si du B(a)P non purifié ou stocké en laboratoire est ajouté à la suspension de cellules la fixation stable n'est plus tardive mais immédiate.

Dans la cellule une certaine période, de six heures environ, est nécessaire avant que les métabolites apparaissent, expliquant le retard constaté dans la fixation stable. Mais d'autres expériences doivent être entreprises afin de délimiter avec précision la chronologie des év nements au niveau des cellules.

Ainsi, une étude d'approche de la phase d'initiation est réalisée. Toutefois, les sites de la fixation sont encore à déterminer, les divers travaux signalant que le B(a)P se fixe à peu près sur tous les constituants biochimiques de la cellule : l'ADN, l'ARN et les protéines.

TABLE DES MATIERES

	Pages
INTRODUCTION	1 - 5
Propriétés chimiques du Benzo(a)pyrène ou B(a)P	
PREMIER CHAPITRE : EFFETS BIOLOGIQUES DU BENZO(a)-PYRENE-B(a)P	6 - 24
I - EFFETS BIOLOGIQUES DU B(a)P SUR L'ANIMAL	6 - 11
1°/ Toxicité du B(a)P	
2°/ Effets du B(a)P sur le tissu sous-cutané ou tissu conjonctif	
3°/ Effets du B(a)P sur le tube digestif	
4°/ Effets du B(a)P sur le poumon et les voies respiratoires	
5°/ Action sur d'autres tissus	
6°/ Effets du B(a)P en association avec des virus.	
II - EFFETS DU B(a)P SUR LA PEAU DE SOURIS	11 - 21
1°/ Introduction	
2°/ Action à court terme du B(a)P sur la peau de souris	
3°/ Action à long terme du B(a)P sur la peau de souris	
III - DISCUSSION	22 - 24

	Pages
DEUXIEME CHAPITRE : ACTION DU B(a)P SUR LES FIBROBLASTES EN CULTURE	25 - 64
I - INTRODUCTION	25
II - REVUE DES TRAVAUX ANTERIEURS	26 - 38
1°/ Toxicité du B(a)P	
2°/ Efficacité de clonage	
III - MATERIEL ET METHODES	39 - 47
1°/ Matériel	
2°/ Méthodes.	
IV - RESULTATS	47 - 64
1°/ Morphologie des colonies	
2°/ Efficacité de clonage et efficacité de transformation	
3°/ Transformation en deux phases	
4°/ Discussion	
TROISIEME CHAPITRE : FIXATION DU B(a)P PAR LES CELLULES IN VITRO	65 - 93
I - INTRODUCTION	65 - 68
II - MATERIEL ET METHODES	69 - 81
1°/ Les cellules	
2°/ Le B(a)P	

Pages

3°/ Schéma expérimental

4°/ Etudes préliminaires

III - ASPECTS GENERAUX DE LA FIXATION 81 - 87

1°/ Fixation par les cellules BP 8

2°/ Fixation par d'autres types cellulaires

IV - NATURE DE LA FIXATION 87 - 93

1°/ Matériel et méthodes

2°/ Résultats

DISCUSSION GENERALE 94 - 102

BIBLIOGRAPHIE

ALFRED, L. J., GLOBERSON, A., BERWALD, Y. and PREHN, R. T.
Differential toxicity response of normal and neoplastic cells in vitro to 3,4-benzopyrene and 3-methylcholanthrene.
Brit. J. Cancer, 1964, 18, 159-164.

ALLISON, A. C., MALUCCI, L.
Uptake of hydrocarbon carcinogens by lysosomes.
Nature, 1964, 203, 1024-1027.

BARKER, B. E., SANFORD, K. K.
Cytologic manifestations of neoplastic transformation in vitro.
J. Natl Cancer Inst., 1970, 44, 39-63.

BECK, S.
Sarcoma produced by subcutaneous injections of overheated cottonseed oil into mice.
Brit. J. Exptl Path., 1941, 22, 299.

BECK, S. and PEACOCK, P. R.
The latent carcinogenic action of 3,4-benzopyrene. Results of intermittent applications to the skin of mice.
Brit. J. Exp. Path., 1940, 21, 227-230.

BERENBLUM, I.

Cocarcinogenesis.

Brit. Med. Bull., 1947, 4, p. 343-345.

BERENBLUM, I.

A speculative review : the probable nature of promoting action and its significance in the understanding of the mechanism of carcinogenesis.

Cancer Res., 1954, 14, 471-477.

BERENBLUM, I.

Some recent advances in skin carcinogenesis.

Dans : Annals of Royal College of Surgeons of England, 1957, 21, 339-357.

BERENBLUM, I.

The two-stage mechanism of carcinogenesis as an analytical tool.

Cellular Control Mechanisms and Cancer, Elsevier Publishing Company, 1964, 260-267.

BERENBLUM, I. and HARAN, N.

The influence of croton oil and of polyethylene glycol-400 on carcinogenesis in the forestomach of the mouse.

Cancer Res., 1955, 15, 510-516.

BERENBLUM, I. and HARAN-GHERA, N.

The induction of initiating phase of skin carcinogenesis in the mouse by oral administration of DMBA, MC; BP, DBA.

Brit. J. Cancer, 1957, XI, 85-87.

BERENBLUM, I. et SHUBIK, P.
A new quantitative approach to the study of the stages of chemical carcinogenesis in the mouse's skin.
Brit. J. Cancer, 1947, 1, 383-391.

BERENBLUM, I. and SHUBIK, P.
An experimental study of the initiating stage of carcinogenesis and a reexamination of the somatic cell mutation theory of cancer.
Brit. J. Cancer, 1949, 3, p. 109-118.

BERWALD, Y. and SACHS, L.
In vitro cell transformation with chemical carcinogens.
Nature, 1963, 200, 1182-1184.

BERWALD, Y. and SACHS, L.
In vitro transformation of normal cells to tumor cells by carcinogenic hydrocarbons.
J. Natl Cancer Inst., 1965, 35, 641-661.

BLACKLOCK, J.W.S.
The production of lung tumors in rats by 3,4-benzpyrene, methylcholanthrene and the condensate from cigarette smoke.
Brit. J. Cancer, 1957, 11, 181-191.

BLAIR, W. H., CHEN, K. C., BASAVARAJ, H. K.
Induction of squamous cell neoplasia in rats with a benzo(a)-pyrene-ferric oxide mixture.
N.I.H. - N.C.I. Abstracts, 1972, n° 74, p. 19.

BOCK, F. G.
Early effects of hydrocarbons on mammalian skin.
Prog. Exp. Tumor Res., 1964, 4, 126-168 (Karger, Basel, New-York).

BORUM, K.

The role of the mouse hair cycle in epidermal carcinogenesis.

Acta Path. Scand., 1954, 34, 542-553.

BOYLAND, E., GREEN, B.

The interaction of polycyclic hydrocarbons and nucleic acids.

Brit. J. Cancer, 1962, 16, 507-517.

BROOKES, P.

On the interaction of carcinogens with DNA.

Biochem. Pharmacol., 1971, 20, 999-1003.

BROOKES, P. and DUNCAN, M. E.

Carcinogenic hydrocarbons and human cells in culture.

Nature, 1971, 234, 40-43.

BROOKES, P. and LAWLEY, P. D.

Evidence for the binding of polynuclear aromatic hydrocarbons to the nucleic acids of mouse skin. Relation between carcinogenic power of hydrocarbons and their binding to DNA.

Nature, 1964, 202, 781-784.

BRYAN, W. R. and SHIMKIN, M.B.

Quantitative analysis of dose response data obtained with 3 carcinogenic hydrocarbons in strain C_3H male mice.

J. Natl Cancer Inst., 1943, 3, 503-531.

BUSCHER, H. P., FEIT, J., OELHERT, W.

Vergleichende Untersuchungen zur Bindung von 3,4 und 1,2 BP an lösliche und nichtlösliche Fraktionen der Schweinehaut.

Z. Krebsforsch., 1968, 70, 287-294.

CALCUTT, G., PAYNE, S.

The intracellular distribution of 3:4-benzpyrene during metabolism in the mouse liver.

Brit. J. Cancer, 1953, 7, 279-282.

CALCUTT, G. and PAYNE, S.
The intracellular metabolism of 3:4-benzpyrene : sites of oxidation in mouse liver.
Brit. J. Cancer, 1954, 8, 554-560.

CARRUTHERS, Ch. and BHATTACHARAYA, H.,
Antigenic changes in mouse epidermis at various stages of neoplastic transformation.
Gann, 1972, 63, 299-305.

CASU, B., DANSI, A., GARZIA, A., MORELLI, E., REGGIANI, M., SANT'ELIA, F.,
Esperimenti sull'azione del fegato in vitro sopra il 3,4-benzopirene.
Tumori, 1951, 37, 527-538.

CHALMERS, J. G. and PEACOCK, P. R.
Further evidence regarding the elimination of certain polycyclic hydrocarbons from the animal body.
Biochem. J., 1936, 30, 1242-1248.

CHAN, P. C., SANDERS, F. K., WYNDER, E. L.
Effect of 3,4-benzo(a)pyrene on mouse lung primordia in vitro.
Nature, 1969, 223, 847-848.

CHOUROULINKOV, I., LAZAR, P., IZARD, C., LIBERMANN, C. and GUERIN, M.
"Sebaceous glands" and "hyperplasia tests" as screening methods for tobacco tar carcinogenesis.
J. Natl Cancer Inst., 1969, 42, 981-985.

CHOUROULINKOV, I., GENTIL, A. et GUERIN, M.
Etude de l'activité carcinogène du DMBA et du B(a)P administrés par voie digestive.
Bull. Cancer, 1967, 54, 67-78.

CLAR, E.
Polycyclic hydrocarbons.
Academic Press. London. Volume 2 p. 130.

COLLINS, V. J., GARDNER, W. Y., STRONG, L. C.
Experimental gastric tumors in mice.
Cancer Res., 1943, 3, 29.

COOK, J. W., HEWETT, C. L., and HIEGER, I.
The isolation of a cancer-producing hydrocarbon from coal tar. II. Isolation of 1,2- and 4,5-benzopyrenes, perylene and 1,2-benzanthracene.
J. Chem. Soc., 1933, 396-398.

CROCKER, T. T., CHASE, J. E., WELLS, S.A. and NUNES, L. L.
Preliminary report on experimental squamous carcinoma of the lung in hamsters and in a primate (Galago crassi caudatus).
Morph. Exp. Resp. Carcino., 1970, 21, 317-328.

DELLA PORTA, G., KOLB, L., SHUBIK, P.
Induction of tracheobronchial carcinomas in the syrian golden hamster.
Cancer Res., 1958, 18, 592-597.

DELWAIDE, P. A.
Etudes sur l'action biologique du benz(a)pyrène. III - Localisation du benz(a)pyrène tritié chez le rat après administration intrapéritonéale.
Biochem. Pharmacol., 1969, 18, 1275-1283.

DIAMOND, L.
The interaction of chemical carcinogens and cells in vitro.
Prog. Exp. Tumor Res., 1969, 11, 364-383 (ed. Karger, Basel, New-York).

DIAMOND, L.
Metabolism of polycyclic hydrocarbons in mammalian cell cultures.
Int. J. Cancer, 1971, 8, 451-462.

DIETZ, M. H. and FLAXMAN, B. A.
Toxicity of aromatic hydrocarbons on normal human epidermal cells in vitro.
Cancer Res., 1971, 31, 1206-1209.

DI PAOLO, J. A. and DONOVAN, P. J.
Properties of syrian hamster cells transformed in the presence of carcinogenic hydrocarbons.
Exptl Cell Res., 1967, 48, 361-377.

DI PAOLO, J. A., DONOVAN, P. J. and NELSON, R.
Quantitative studies of in vitro transformation by chemical carcinogens.
J. Natl Cancer Inst., 1969a, 42, 867-876.

DI PAOLO, J. A., NELSON, R. L. and DONOVAN, P. J.
Sarcoma-producing cell lines derived from clones transformed in vitro by benzo(a)pyrene.
Science, 1969b, 165, 917-918.

DONIACH, I. et MOTTRAM, J. C.
On the effect of light upon the incidence of tumours in painted mice.
Am. J. Cancer, 1940, 39, 234-240.

DONIACH, I., MOTTRAM, J. C. and WEIGERT, F.
The fluorescence of 3,4-BP in vivo. I. The distribution of fluorescence at different sites, especially the skin of mice.
Brit. J. Expt. Path., 1943, 24, 1-9.

DONTENWILL, W.
Experimentelle Untersuchungen über den Einfluss von Hormonen auf das Walker-carcinom der Ratte und auf die Entwicklung des Benzpyrentumors der Mäusehaut.
Z. Krebsforsch., 1955, 60, 482-513.

DONTENWILL, W., ELMENHORST, H., RECKZEH, G., HARKE, H. P., STADLER, L.
Experimentelle Untersuchungen über Aufnahme, Abtransport und Abbau cancerogener Kohlenwasserstoffe im Bereich der Respirationstraktes.
Z. Krebsforsch., 1968, 71, 225-243.

DUNCAN, M., BROOKES, P., DIPPLE, A.
Metabolism and binding to cellular macromolecules of a series of hydrocarbons by mouse embryo cells in culture.
Int. J. Cancer, 1969, 4, 813-819.

EARLE. W.R, BRYANT, J. C. and SCHILLING, E. L.
Ann. New York, Acad. Sci., 1954, 58, 1000.

EKWALL, P., ERMELA, P., SETALA, K. and SJOBLOM, L.
Gastric absorption of 3,4-benzpyren. II. The significance of the solvent for the penetration of 3,4-benzpyrene in the stomach wall.
Cancer Res., 1952, 11, 758-763.

EMBLETON, M. J. and HEIDELBERGER, C.
Antigenicity of clones of mouse prostate cells transformed in vitro.
Int. J. Cancer, 1972, 9, 8-18.

ERMELA, P., SETALA, K. and EKWALL, P.
Gastric absorption of 3,4-benzpyrene. I. The effect of physiological processes on absorption.
Cancer Res., 1951, 11, 753-757.

EVENSEN, A.
Effects of carcinogens on cell proliferation.
In : Experimental skin carcinogenesis in mice par IVERSEN, O.H. et EVENSEN,A., 1962, 95-143.
Norvegian Monographs on Medical Science.

FALK, H. L.
Metabolism of benzo(a)pyrene in rats with and without liver injury.
Acta Unio Int. contra Cancrum, 1963, 19, 528-530.

FALK, H. L., KOTIN, P., LEE, S. S. and NATHAN, A.
Intermediary metabolism of benzo(a)pyrene in the rat.
J. Natl Cancer Inst., 1962, 28, 699-724.

FERON, V. J.
Respiratory tract tumors in hamsters after intratracheal instillations of benzo(a)pyrene alone and with furfural.
Cancer Res., 1972, 32, 28-36.

FRIEDEWALD, W. E.
Cell states as affecting susceptibility to a virus.
J. Exp. Med., 1942, 75, 197-218.

GAGNE, F., POULIN, M., LACOUR, F. et GUERIN, M.
Cancérisation du bassinet par le benzopyrène après hydronéphrose provoquée chez le rat et la souris.
Bull. Cancer, 1954, 41, 270-279.

GELBOIN, H. V.
A microsome-dependent binding of benzo(a)pyrene to DNA.
Cancer Res., 1969, 29, 1272-1276.

GELBOIN, H. V., HUBERMAN, E., SACHS, L.
Enzymatic hydroxylation of benzopyrene and its relationship to cytotoxicity.
Proc. Natl Acad. Sci., 1969, 64, 1188-1194.

GENTIL, A., LASNE, C., CHOUROULINKOV, I.
Métabolisme du 7,12-diméthylbenz(a)anthracène (DMBA) par des souris normales ou prétraitées par le 3-méthylcholanthrène (MC) : distribution des principaux métabolites dans le tractus digestif et le mésentère.
C.R. Acad. Sci., Paris, 1971, 273, 1763-1766.

GORER, P. A.
Quelques variations dans la réponse à l'homogreffe tumorale chez les souris.
La Biologie des Homogreffes, 1957, 243-258 (Coll. Interne du CNRS).

GOSHAM, L. M. et HEIDELBERGER, C.
Binding of tritium-labeled polycyclic hydrocarbons to DNA of mouse skin.
Cancer Res., 1967, 27, 1678-1688.

GRAFFI, A.
Fluorescenzmikroskopische Untersuchungen der Mausehaut nach Pinselung mit Benspyren-Benzollösungen.
Z. Krebsforsch., 1942, 52, 165-184.

GRANT, G. A., CARTER, R. L., ROE, F. J. C. and PIKE, M. C.
Effects of the neonatal injection of carcinogen on the induction of tumours by the subsequent application to the skin of the same carcinogen.
Brit. J. Cancer, 1968, XXII, 346-358.

GRANT, R. et IVY, A. C.
D'après : Survey of compounds which have been tested for carcinogenic activity (1969)
Gastroenterology, 1955, 29, 199-218.

GUERIN, M.
New inbred strain "IC" mouse.
News Letter, 1964, 30, 41.

GUERIN, M. et CUZIN, J.
Tests cutanés chez la souris pour déterminer l'activité carcinogène des goudrons de fumée de cigarettes.
Bull. Cancer, 1961, 48, 111-121.

HAMPERL, H., GRAFFI, A. and LANGER, E.
Zur Kenntnis der Wirkungsweise des Benspyrens auf die Mäusehaut.
Z. Krebsforch., 1943, 53, 133.

HARRIS, C. C., SPORN, M. B., KAUFMAN, D. G., SMITH, J. M., JACKSON, F. E. and SAFFIOTTI, U.
Histogenesis of squamous metaplasia in the hamster tracheal epithelium caused by vitamin A deficiency or benz(a)pyrene ferric oxide.
J. Natl Cancer Inst., 1972, 48, 743-761.

HARVEY, G., SLOANE, I., LOESER, C. N.
Spectroscopic analysis of carcinogenic hydrocarbons in biologic interaction in vivo and in vitro.
Cancer Res., 1963, 23, 1555-1565.

HEIDELBERGER, C.
Quantitative studies on hydrocarbon carcinogenesis in vitro.
The Jerusalem Symposia on Quantum Chemistry and Biochemistry.
The Israel Academy of Sciences and Humanities.
Jerusalem, 1969, 45-58.

HEIDELBERGER, C., WEISS, S. M.
The distribution of radioactivity in mice following administration of 3,4-BP 5-^{14}C and 1,2,5,6 DBA 9,10-^{14}C.
Cancer Res., 1951, 11, 885-891.

HERROLD, K. M. and DUNHAM, L. J.
Induction of carcinoma and papilloma of the tracheobronchial mucosa in the Syrian hamster by intratracheal instillations of B(a)P.
J. Natl Cancer Inst., 1962, 28, 467-491.

HIEGER, I.
Carcinogenesis by cholesterol.
Brit. J. Cancer, 1959, 13, 439-451.

HIEGER, I.
Carcinogenesis.
Academic Press. London, 1961, 47-60.

HO, W., BENTON, M. and FURST, A.
The clearance of benzo(a)pyrene and ferric oxide from mouse lungs.
Proc. West. Pharmacol. Soc., 1972, 15, 58-60.

HOMBURGER, F.

Chemical carcinogenesis in Syrian hamster.

Prog. Exptl Tumor Res., 1972, 16, 152-174 (ed. Karger, Basel).

HOPEWELL, J. W., WRIGHT, E. A.

The importance of implantation site in cerebral carcinogenesis in rats.

Cancer Res., 1969, 29, 1927-1931.

HUBERMAN, E., SACHS, L.

Cell susceptibility to transformation and cytotoxicity by the carcinogenic hydrocarbon benzo(a)pyrene.

Proc. Natl Acad. Sci., 1966, 56, 1123-1129.

HUBERMAN, E., SELKIRK, J. K., HEIDELBERGER, C.

Metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons in cell cultures.

Cancer Res., 1971, 31, 2161-2167.

HUBERT-HABART, M.

Le benzo-3,4-pyrène pyroformé dans les produits de combustion de la cigarette. Détection, dosage, recherche des facteurs d'inhibition.

Thèse d'Université, Paris.

HUEPER, W. C.

Occupational and environmental cancers of the respiratory system.

in : Recent Results in Cancer Res., 1966, 3, 112-114.

HUGGINS, C. and MORII, S.

Selective adrenal necrosis and apoplexy induced by 7,12-dimethylbenz(a)anthracene.

J. Exp. Med., 1961, 114, 741-760.

KENNAWAY, E. L.

The formation of a cancer producing substance from isoprene.

J. Path. Bact., 1924, 27, 233

KLEIN, G.

Tumour-specific transplantation antigens.

G.H.A. Clowes Memorial Lecture

Cancer Res., 1968, 28, 625-635.

KOTIN, P., FALK, H. L., and BUSSER, R.

Distribution, retention, and elimination of C^{14}-3,4-benzpyrene after administration to mice and rats.

J. Natl Cancer Inst., 1959, 23, 541-555.

KOURI, R. E., LUBET, R. A., BROWN, D. Q.

In vitro cellular uptake of benzo(a)pyrene measured by a microfluorometric technique.

Proc. Soc. Exptl Biol. Med., 1971, 136, 1038-1044.

KURATSUNE, M., MASUDO, Y. and MORI, K.

Polycyclic aromatic hydrocarbons in Japanese smoked fishes.

Ninth International Cancer Congress, 1966.

KUROKI, T. and HEIDELBERGER, C.

The binding of polycyclic aromatic hydrocarbons to the DNA, RNA and proteins of transformable cells in culture.

Cancer Res., 1971, 31,2168-2176.

KUSCHNER, M., LASKIN, S., CRISTOFANO, E. and NELSON, N.

Experimental carcinoma of the lung.

Proc. Nat. Cancer Conf., 1956, 3, 485-495.

LACASSAGNE, A., et NYKA, W.
Faible réaction à l'injection intraveineuse du virus de Shope au niveau des papillomes obtenus par badigeonnage au benzopyrène chez des lapins à hypophyse détruite.
Bull. Assoc. Fr. Et. Cancer, 1937, 26, 154.

LASKIN, S., KUSCHNER, M. and DREW, R. T.
Studies in pulmonary carcinogenesis.
Inhalation carcinogenesis, 1970, 18, 321-352.

LASNITZKI, I.
The effect of 3,4-benzpyrene on human foetal lung grown in vitro.
Brit. J. Cancer, 1956, 10, 510-516.

LAZAR, P., LIBERMANN, C., CHOUROULINKOV, I. et GUERIN,M.
Tests sur la peau de souris pour la détermination des activités carcinogènes : mise au point méthodologique.
Bull. Cancer, 1963, 50, 567-577.

LIBERMANN, C., LAZAR, P., CHOUROULINKOV, I. et GUERIN, M.
Response of an active component of croton oil to short-term tests of carcinogenicity.
Nature, 1968, 217, 563-564.

LINELL, F. and NORDEN, I. G.
Studies of the action of carcinogenic hydrocarbons on the skin of the rabbit. 1. The tumour producing effect : a comparison between 3,4-BP and 9,10-DMBA and between different areas of the skin.
Acta Pathol., 1950, XXVII, fas. 3, 394-413.

LITTLE, J. B., GROSSMAN, B. N. and O'TOOLE, W. F.
Respiratory carcinogenesis in hamsters induced by polonium-210 alpha radiation and B(a)P.
Morph. Exp. Resp. Carc., 1970, 21, 383-394.

LOMBARD, L. S. and VESSELINOVITCH, S. D.
Renal carcinogenesis by benzo(a)pyrene.
N.I.H. - N.C.I., 69, 2087, Abstracts, 1972, p. 49, n° 194.

Mac PHERSON, I.
The characteristics of animal cells transformed in vitro.
Adv. Cancer Res., 1970, 13, 169-215.

Mac PHERSON, I. and BRYDEN, A.
Mitomycin C treated cells as feeders.
Exptl Cell Res., 1971, 69, 240-241.

Mac PHERSON, I. and MONTAGNIER, L.
Agar suspension culture for the selective assay of cells transformed by polyoma virus.
Virology, 1964, 23, 291-294.

MAISIN, J.
cité dans "Survey in Coumpounds". Bull. Assoc. Franç. Et. Cancer, 1940, p. 6-23.

MAISIN, J. et DE JONGHE,
Au sujet de l'action de la lumière et de l'ozone sur certains corps cancérigènes.
C.R. Soc. Biol., 1934, 117, 111-114.

MARQUARDT, H., KUROKI, T., HUBERMAN, E., SELKIRK, J. K., HEIDELBERGER, C., GROVER, P. L. and SIMS, P.
Malignant transformation of cells derived from mouse prostate by epoxides and other derivatives of polycyclic hydrocarbons.
Cancer Res., 1972, 32, 716.

MEDINA, D., and SACHS, L.
Studies on the lytic interaction and cell transformation with a large and a small-plaque mutant of polyoma virus.
Virology, 1963, 19, 127-139.

MILLER, E. C.
Studies on the formation of protein bound derivatives of 3-4 BP in the epidermal fraction of mouse skin.
Cancer Res., 1951, 11, 100-108.

MILLER, J. A., MILLER, E. C.
Chemical carcinogenesis : Mechanisms and approaches to its control. Symposium on mechanisms and control of oncogenesis-guest.
Editorial, American Association for Cancer Research, Chicago, 10 avril 1971.

MILLER, L., SMITH, W. E., BERLINER, S. W.
Tests for effect of asbestos on benzo(a)pyrene carcinogenesis in the respiratory tract.
Ann. N.Y. Acad. Sci., 1965, 132, 489-500.

MONDAL, S. and HEIDELBERGER, C.
In vitro malignant transformation by methylcholanthrene of the progeny of single cells derived from C3H mouse prostate.
Proc. Natl Acad. Sci., 1970, 65, 219-225.

MONTAGNIER, L.

La croissance sélective en gélose de cellules transformées par un virus cancérogène.

Path. Biol., 1966, 14, 244-251.

MONTAGNIER, L.

Altérations de la surface des cellules BHK 21 en rapport avec leur transformation par des virus oncogènes.

Coll. Intern. CNRS, 2ème coll. intern. sur les virus oncogènes, juin 1969.

ed. CNRS, 1970, 183, 20-33.

MULLER, J. H.

Uber experimentelle Uteruskarzinome beim Kaninchen nach implantation von benzpyren in die Ovarien.

Schw. Med. Woch., 1949, 79, 556.

NORDEN, G.

Studies of the action of carcinogenic hydrocarbons on the skin of the rabbit.

Acta Path. Microb. Scand., 1954, 35, 433-436.

NORDEN, G.

The uptake of 3,4-BP in the stomach of the mouse.

Acta Path. Microbiol. Scand., 1957a, 40, 188-196.

NORDEN, G.

Fluorescence analysis of skin of guinea-pig, mouse and rabbit after application of 3,4-benzpyrene.

Acta Path. Microbiol. Scand., 1957b, 40, 296-302.

NORDEN, G.
The rate of appearance, metabolism and disappearance of 3,4-B(a)P in the epithelium of mouse skin after a single application in a volatile solvent.
Acta Path. Microbiol. Scand., 1953, suppl. 96.

OBERLING, Ch. and GUERIN, M.
Sur les leucémies et les états leucimoïdes obtenus chez la poule par application de goudron ou de carbures cancérigènes.
3ème Congrès Intern. Microbiologie, New-York, 1939a

OBERLING, Ch. et GUERIN, M.
Les réactions épithéliomateuses de la peau du rat après badigeonnage par le benzopyrène
Bull. Cancer, 1947, 34, 30-42.

OBERLING, Ch., GUERIN, M. et GUERIN, P.
Particularités évolutives des tumeurs produites avec de fortes doses de benzopyrène.
Bull. Assoc. Fr. Et. Cancer, 1939b, 28, 198.

OBERLING, Ch., SANNIE, C., GUERIN, M. et GUERIN, P.
Recherches sur l'action cancérigène du 1,2-BP.
Bull. Assoc. Fr. Et. Cancer, 1936, 25, 156-180.

OBERLING, Ch., SANNIE, C., GUERIN, M. et GUERIN, P.
A propos de l'action cancérigène du benzopyrène.
Leeuwenhoek-Vereeniging IV. 5th Conf., Amsterdam, 1937, 57-63.

OELHERT, W. and GRIMM, D.
Distribution et localisation des carcinogènes radioactifs dans l'épiderme de peau de souris, après application locale.
Z. Krebsforsch., 1966, 68, 14-24.

PATAKI, J., HUGGINS, C.

Molecular site of substituents of benz(a)anthracene related to carcinogenicity.

Cancer Res., 1969, 29, 506-509.

PAYNE, S.

The pathological effects of the intraperitoneal injection of 3,4-benzpyrene into rats and mice.

Brit. J. Cancer, 1958, 12, 65-74.

PEACOCK, P. R., BECK, S., ANDERSON, W.

The influence of solvents on tissue response to carcinogenic hydrocarbons.

Brit. J. Cancer, 1949, 3, 296.

PEIRCE, W. E. H.

Tumor-promotion by lime oil in the mouse forestomach.

Nature, 1961, 189, 497-498.

POTT, P. (1775)

Cité par OBERLING dans le "Cancer", éd. Gallimard 1954.

POEL, W. E.

Effect of carcinogenic dosage and duration of exposure on skin-tumor induction in mice.

J. Natl Cancer Inst., 1959, 22, 19-43.

POEL, W. E. and KAMMER, A. G.

Preliminary studies in a quantitative approach to skin carcinogenesis.

J. Natl Cancer Inst., 1956, 16, 989-994.

PREHN, R. T.

Tumor-specific antigens of putatively non-viral tumors.

Cancer Res., 1968, 28, 1326-1330.

PRODI, G., ROCCHI, P., GRILLI, S.

Binding of 7,12-dimethylbenz(a)anthracene and benzo(a)pyrene to nucleic acids and proteins of organs in rats.

Cancer Res., 1970, 30, 1020-1023.

PUCK, T. T. and MARCUS, P. I.

A rapid method for viable cell titration and clone production with HeLa cells in tissue culture. The use of X-irratiated cells to supply conditioning factors.

Proc. Natl Acad. Sci., 1955, 41, 432-437.

PUCK, T. T., MARCUS, P. I. and CIECIURA, S. J.

Clonal growth of mammalian cells in vitro.

J. Exptl Med., 1956, 103, 273-283.

PULLMAN, A. et PULLMAN, B.

Cancérisation par les substances chimiques et structure moléculaire.

Ed. Masson et Cie, 1955.

PYLEV, L. N.

An experimental 3,4-benzpyrene induction of lung cancer in rats.

Vestn. Akad. Med. Nank. SSSR, 1964, 19, 41-45.

PYLEV, L. N.

Induction of lung cancer in rats by intratracheal insufflation of cancerogenic hydrocarbons.

Acta Unio Intern. contra Cancrum, 1962, 19, 688-691.

PYLEV, L. N., ROE, F. J. C. and WARWICK, G. P.
Elimination of radioactivity after intratracheal instillation of tritiated 3,4-B(a)P in hamsters.
Brit. J. Cancer, 1969, 23, 103-115.

RIGDON, R. H.
Lung tumors in the white pekin duck.
Morph. Exptl Resp. Carcinogen., 1970, 21, 281-296.

RIGDON, R. H. and NEAL, J.
Effect of intratracheal injection of B(a)P on ducks.
Texas Rept. Biol. Med., 1965, 23 , 494-506.

RIGDON, R. H. and NEAL, J.
Gastric carcinomas and pulmonary adenomas in mice fed by B(a)P.
Texas Rept. Biol. Med., 1966, 24, 195-207.

RIGDON, R. H. and NEAL, J.
Leukemia in mice fed B(a)P.
Texas Rept. Biol. Med., 1967, 25, 422-431.

RIGDON, R. H. and NEAL, J.
Relationship of leukemia to lung and stomach tumors in mice fed benzo(a)pyrene.
Proc. Soc. Exptl Biol. Med., 1969, 130, 146-148.

ROBB, J. A.
Microcloning and replica plating of mammalian cells.
Science, 1970, 170, 857-858.

ROE, F. J. C., PETO, R., KEARNS, F. and BISHOP, D.
The mechanism of carcinogenesis by the neutral fraction of cigarette smoke condensate.
Brit. J. Cancer, 1970, XXIV, 788-806.

ROGERS, S. and ROUS, P.
Resultats of exposing epidermal cells to a carcinogenic hydrocarbons at time of infection with the Shope papilloma virus.
J. Exp. Med., 1951, 93, 459-488.

ROUS, P. and KIDD, J. G.
Conditional neoplasms and subthreshold neoplastic states.
J. Exp. Med., 1941, 73, 365-390.

ROUSSY, G. et GUERIN, M.
Tumeurs de la rate provoquées par le 3,4-benzopyrène chez le rat.
Bull. Assoc. Fr. Et. Cancer, 1940-1941, 29, 252-259.

ROUSSY, G., GUERIN, M. et GUERIN, P.
Nouvelles recherches sur la transplantation de tissus au cours de leur cancérisation par le benzopyrène.
C.R. Soc. Biol., 1944, 138, 25-27.

ROUSSY, G., OBERLING, Ch., GUERIN, M. et GUERIN, P.
Tumeurs produites par applications intra-cérébrales de carbures cancérigènes.
Medycyna, 1939, n° 13-14, 604-606.

RUSCH, H. P., BAUMANN, C.A. et MAISON, G. F.
Arch. Pathol., 1940, 29, 8 ; dans PFALTZ, K. R. et LACOUR, F.
Le cancer expérimental de l'estomac. Mise au point et recherches personnelles.
Bull. Cancer, 1952, 39, 4-16.

SACHS, L., MEDINA, D., BERWALD, Y.
Cell transformation by polyoma virus in clones of hamster and mouse cells.
Virology, 1962, 17, 491-493.

SAFFIOTTI, U., CEFIS, F., KOLB, L. H.
A method for the experimental induction of bronchogenic carcinoma.
Cancer Res., 1968, 28, 104-124.

SAFFIOTTI, U., CEFIS, F., KOLB, L. H., GROTE, M. I.
Intratracheal injection of particulate carcinogens into hamster lungs.
Proc. Amer. Ass., 1963, 4, 59.

SAFFIOTTI, U., MONTESANO, R., SELLA KUMAR, A. R., CEFIS, F., and KAUFMAN, D. G.
Respiratory tract carcinogenesis in hamsters induced by different numbers of administrations of benzo(a)pyrene and ferric oxide.
Cancer Res., 1972, 32, 1073-1081.

SANDERS, F. K. and BURFORD, B. O.
Ascites tumours from BHK 21 cells transformed in vitro by polyoma virus.
Nature, 1964, 201, 786-789.

SANFORD, K. K.
"Spontaneous" neoplastic transformation of cells in vitro : some facts and theories.
Nat. Cancer Inst. Monogr., 1967, 26, 387-418.

SANNIE, C., OBERLING, Ch., GUERIN, M. and GUERIN, P.
Des modalités de l'action cancérigène du 1,2-BP.
C.R. Soc. Biol., 1935, 120, 1196-1198.

SCHLEDE, E., KUNTZMAN, R., and CONNEY, A. H.
Stimulatory effect of benzo(a)pyrene and phenobarbital pretreatment on the biliary excretion of benzo(a)pyrene metabolits in the rat.
Cancer Res., 1970, 30, 2898-2904.

SETALA, K., and EKWALL, P.
Penetration of benzpyren into the stomach wall of mouse.
Science, 1950, 112, 229-231.

SHABAD, L. M.
Experimental cancer of the lung.
J. Natl Cancer Inst., 1962, 28, 1305-1332.

SHABAD, L. M. and PYLEV, L. N.
Morphological lesions in rat lungs induced by polycyclic hydrocarbons.
Morph. Exptl Resp. Carcinogen., 1970, 21, 227-242.

SHIRES, T. K.
A fluorescent microscopic study of methodologic effects on the intranuclear distribution of B(a)P.
Cancer Res., 1969, 29, 1277-1287.

SIMPSON, W. L. and CRAMER, W.
Sebaceous glands and experimental skin carcinogenesis in mice.
Cancer Res., 1943, 3, 515-518.

SIMS, P.
The metabolism of benzo(a)pyrene by rat-liver homogenates.
Biochem. Pharmacol., 1967, 16, 613-618.

SIVAK, A. and VAN DUUREN, B. L.
Studies with carcinogens and tumor-promoting agents in cell culture.
Extpl Cell Res., 1968, 49, 572-583.

SMITH, W. E., COOPER, N. S. and WYNDER, E. L.
Biological tests of fractions derived from cigarette smoke condensates.
Proc. Am. Ass. Cancer Res., 1954, 1, 45.

SMITH, W. E., MILLER, L. and CHURG, J.
An experimental model for study of cocarcinogenesis in the respiratory tract.
Morph. Exptl. Resp. Carcinogen., 1970, 21, 299-316.

SOBIN, L. H.
High resolution autoradiographic localization of 3,4-BP-^{3}H in mouse skin.
Cancer Res., 1970, 30, 1123-1128.

STEINER, P. E.
Carcinogenicity of multiple chemicals simultaneously administered.
Cancer Res., 1955, 15, 632-635.

SUNTZEFF, V., COWDRY, E. V. and CRONINGER, A.
Microscopic visualisation of the degeneration of sebaceous glands caused by carcinogens.
Cancer Res., 1955, 15, 637-640.

TRUHAUT, R. and DECHAMBRE, R. P.
Modalités de l'induction chez la souris de tumeurs pulmonaires par le benzo(a)pyrène : influence de la dose d'hydrocarbure aromatique et de facteurs écologiques.
C.R. Acad. Sci., 1972, 274, 2263-2267.

VAN DUUREN, B. L.
Tumor promoting agents in two-stage carcinogenesis.
Prog. Exptl Tumor Res., 1969, 11, 31-68.

VAN DUUREN, B. L. and SIVAK, A.
Tumor-promoting agents from Croton tiglium L and their mode of action.
Cancer Res., 1968, 28, 2349-2356.

WYNDER, E. L. and HOFFMANN, D.
Tobacco and tobacco smoke.
Studies in Experimental Carcinogenesis. New-York, Academic Press, 1967, p. 330.

WYNDER, E. L., FRITZ, L. and FURTH, N.
Effect of concentration of benzopyrene in skin carcinogenesis.
J. Natl Cancer Inst., 1957, 19, 361-370.

YAMAGIWA, K. and ITCHIKAWA, K.
Experimental study of the pathogenesis of carcinoma.
J. Cancer Res., 1918, 3, 1.

YASUMURA, Y., BUONASSISI, V., SATO, G.
Clonal analysis of differentiated function in animal cell cultures. I. Possible correlated maintenance of differentiated function and the diploid karyotype.
Cancer Res., 1966, 26, 529-535.

ZIMMERMANN, H. M. et ARNOLD, H.
Experimental brain tumors. III. Tumors produced with benzopyrene.
Cancer Res., 1943, 3, 682-685.

ACADÉMIE DE PARIS

UNIVERSITÉ DE PARIS VI

4, Place Jussieu - 75230 PARIS-CEDEX 05

SERVICE DE LA SCOLARITE

Bureau des Enseignements du 3e cycle

TÉLÉPHONE : 336-25-25 - 325-12-21

PERMIS D'IMPRIMER

DOCTORAT : D'ETAT

THESE DE : SCIENCES NATURELLES

NOM : Madame LASNE Née MARTY

Prénoms : Claude

né le 14 Mars 1937 à Belfort (Territoire de Belfort) Dépt :

1ère THESE : "Le benzo(a) pyrene :ses effets biologiques et sa pénétration in vitro dans la cellule ".

2e THESE (Propositions faites par l'Université) :

ESIDENT.M.THOMAS

AMINATEURS.MM.HOLLANDE
MONIER
CHOUROULINKOV

Vu et Approuvé

PARIS, le 3 Juillet 1973

Le Président

de l'Université de PARIS VI